

**DIE PRIMÄRSTRUKTUR DES 105 AMINOSÄURERESTE
ENTHALTENDEN KOLLAGENPEPTIDES $\alpha 1$ (780) –CB C**

Klaus von der Mark

München

1971

DIE PRIMÄRSTRUKTUR DES 105 AMINOSÄURERESTE ENTHALTENDEN
KOLLAGENPEPTIDES $\alpha 1(780)$ -CB C

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Klaus von der Mark
aus
Dresden

München 1971



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 1971

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr.K.Kühn durchgeführt.

Herrn Prof.Kühn danke ich sehr herzlich für das mir entgegengebrachte Wohlwollen und die großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Fräulein Karin Holland und Fräulein Ingrid Kell bin ich für ihre wertvolle technische Mithilfe zu besonderem Dank verbunden.

Mein Dank gilt ferner Frau Dr.M.Stark für die gründliche Einweisung in die Methoden der Kollagenchemie, Herrn P.Wendt und Herrn Dr.F.Rexrodt für die gute Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Aminosäuresequenz und allen Mitarbeitern, die mir durch Ratschläge und Diskussionen wertvolle Anregungen gegeben haben.

Abkürzungen und Nomenklatur:

CB-Peptide	Peptide, die durch Bromcyanspaltung eines längeren Peptides entstehen.
Col 1	Peptid, das durch Collagenasespaltung eines tryptischen Peptides erhalten wurde.
SLK	Säurelösliches Kollagen
SLS	Segment-Long-Spacing
T 1	Tryptisches Peptid; Die Ziffer bezeichnet die Reihenfolge der Peptide vom Aminoende her.
TPCK	Tosylamido - 2-phenyl-äthylchlormethylketon
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
Dansyl-Cl	1-Dimethylamino-naphtyl-5-sulfochlorid
Molekülfragment 780:	Tripelhelikales Molekülbruchstück, das durch Kollagenaseabbau von nativem Kollagen erhalten wird. Die Zahl bezeichnet die Länge des Moleküls in Å.
Kettenfragment $\alpha 1(780)$:	Bruchstück der $\alpha 1$ -Kette, das durch Denaturierung des Molekülbruchstückes 780 entsteht. Die Ziffer bezeichnet die Länge des Kettenfragmentes.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.1. <u>EINLEITUNG</u>	1
1.2. <u>AUFGABENSTELLUNG</u>	8
2. <u>ERGEBNISSE</u>	8
2.1. <u>Die Bromcyanspaltung des Kettenfragmentes $\alpha 1(780)$</u>	8
2.1.1. Präparative Darstellung von $\alpha 1(780)$	8
2.1.2. Die Bromcyanspaltung von $\alpha 1(780)$ und die Isolierung der CB-Peptide $\alpha 1(780)$ -CB N und -CB C	13
2.1.3. Zusammenfassung des 1. Teils	19
2.2. <u>Die Aminosäuresequenz von $\alpha 1(780)$-CB C</u>	21
2.2.1. Isolierung und Reinigung der tryptischen Peptide	21
2.2.2. Die Aminosäuresequenz der tryptischen Peptide	29
2.2.3. Die Reihenfolge der tryptischen Peptide	36
2.2.4. Die Aminosäuresequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C	39
3. <u>DISKUSSION</u>	41
4. <u>Experimenteller Teil</u>	49
4.1. Darstellung von $\alpha 1(780)$ -CB C	49
4.2. Sequenzierung von $\alpha 1(780)$ -CB C	53
5. <u>LITERATUR</u>	58

1.1. EINLEITUNG

Kollagen, ein Faserprotein, stellt den Hauptbestandteil des Bindegewebes der Haut, der Sehnen, Knochen, Knorpel und Zähne dar. Es übt vorwiegend mechanische Funktionen aus, ist aber auch an der Wasser- und Elektrolytregulation, der Wundheilung und der Gewebeerneuerung beteiligt.

Das monomere Kollagenmolekül hat ein Molekulargewicht von 300 000 und besteht aus drei zu einer Tripelhelix verdrehten Polypeptidketten von je 1000 Aminosäureresten Länge. Das steife stabchenförmige Molekül ist 3000 Å lang und hat einen Durchmesser von 14 Å.

Nach der Biosynthese in den Fibroblasten lagern sich die Kollagenmoleküle durch Bildung von Quervernetzungsbindungen zu Fibrillen zusammen, die sich im Gewebe zu einer Raumnetzstruktur verknüpfen.

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, daß ohne Kenntnis der Aminosäuresequenz des Kollagens wesentliche Fragen wie Biosynthese des Kollagens, die Steuerung der Fibrillenbildung, die Reifung und Alterung der Quervernetzungen und die Bildung des dreidimensionalen Faserverbandes im extrazellulären Raum nicht endgültig geklärt werden konnten.

Die Aufklärung der Aminosäuresequenz des Kollagenmoleküls, das im Falle des Säugetierkollagens aus einer α_2 - und zwei α_1 -Ketten besteht, scheiterte bis vor kurzem daran, daß es nicht gelang, das Kollagenmolekül spezifisch und reproduzierbar in kürzere, den bekannten Sequenzierungsmethoden zugängliche Bruchstücke zu spalten.

Grassmann, Hannig et al. (2, 3) hatten bereits in den Jahren 1960 - 1963 Kalbshautkollagen mit Trypsin gespalten und versucht, die tryptischen Peptide zu isolieren. Da man zu jener Zeit noch nicht imstande war, die α_1 - oder α_2 -Ketten zu isolieren, wurde die Trypsinspaltung am gesamten, denaturierten

Kollagen vorgenommen. Dem Arginin- und Lysingehalt des Kollagens entsprechend waren dabei etwa 250 Peptide zu erwarten, eine Zahl, die die Isolierung aller Peptide nahezu aussichtslos erscheinen ließ. Grassmann, Hannig et al. konnten trotzdem durch Elektrophorese und Ionenaustauscherchromatographie eine Anzahl von trypt. Peptiden isolieren, die Aufschluß über den Sequenzaufbau des Kollagens gaben. Ähnliche Spaltungsversuche wurden mit Chymotrypsin und bakterieller Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* unternommen. Zusammen mit den Ergebnissen, die Schroeder u. Kroner durch Partialhydrolyse von Gelantine erhielten, konnten daraufhin folgende Aussagen über die Primärstruktur des Kollagens gemacht werden: (s.a. (4))

a) Apolare Aminosäuren wie Gly, Ala, Pro, Hypro etc. und polare Aminosäuren wie Asp, Glu, Lys und Arg sind nicht gleichmäßig über die Kette verteilt, sondern konzentrieren sich alternierend in getrennten Sequenzbereichen.

b) Bei über 86 % der untersuchten Peptide wurde in jeder 3. Position Glycin gefunden. (Das ist aus sterischen Gründen Voraussetzung für die Bildung der Kollagentripelhelix, wie sie Rich und Crick (5) postulierten.) Inzwischen wurden diese Befunde von Kang, Bornstein et al. (6) und Stark, Rautenberg et al. (7) dahingehend erweitert, daß nur etwa 2 % der Sequenz, und zwar die 10 bis 15 äußersten Aminosäuren an beiden Enden, nicht an jeder 3. Stelle Glycin haben und damit keine tripelhelikale Struktur haben können.

c) Die apolaren Sequenzbereiche sind vorwiegend aus Tripeptiden mit der Sequenz Gly-Pro-X und Gly-X-Hypro aufgebaut. Hydroxyprolin, die neben Hydroxylysin für Kollagen charakteristische Aminosäure, wurde nur an dritter Stelle eines Tripletts, das mit Glycin beginnt, gefunden.

Hydroxyprolin wird nicht als Aminoacyl- t-RNS-Verbindung in die Peptidkette eingebaut - es besitzt keinen eigenen Codon -, sondern es entsteht durch Hydroxylierung von bestimmten Prolinresten im fertigen Peptidverband im ribosomalen Komplex oder kurz nach dessen Ablösung. Da die Hydroxylierung durch die Protokollagen-Prolinhydroxylase nicht immer vollständig

verläuft, wurde bei der Bestimmung der Primärstruktur neben Hydroxyprolin meist auch ein Anteil von Prolin gefunden.

Ein aussichtsreicher Weg, weniger und dafür längere Kollagenbruchstücke als die trypt. Peptide herzustellen, war die Hydroxylaminspaltung. Gallop, Blumenfeld et al. (8) und Volpin u. Hörmann (9) zeigten, daß Kollagen an 5 - 6 Stellen durch Hydroxylamin zu spalten ist und postulierten daher Untereinheiten, die durch esterähnliche Bindungen verknüpft sein sollten. Bornstein (10, 11) zeigte jedoch später, daß die hydroxylaminsensitive Bindung eine normale Gly-Asp Peptidbindung ist, und das Kollagenmolekül also doch aus durchgehenden Peptidketten besteht. Volpin und Hörmann (9) konnten durch Hydroxylaminspaltung von Kalbshautkollagen mehrere definierte Bruchstücke der $\alpha 1$ -Kette isolieren.

Den entscheidenden Schritt zur gezielten Herstellung von größeren Kollagenpeptiden vollzogen Piez, Bornstein, Butler u. Kang, als sie die Bromcyanspaltungsmethode auf die $\alpha 1$ -Kette von Rattenhautkollagen anwandten (12, 13). Piez u. Eigner hatten durch die Trennung von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten von denaturiertem Kollagen die Voraussetzung dazu geschaffen (14).

Bei der Bromcyanspaltungsmethode nach Gross und Witkop (15) werden die Peptidketten ausschließlich am Carboxylende des Methionins gespalten, wobei das Methionin in Homoserin umgewandelt wird.

Die $\alpha 1$ -Kette des Rattenhautkollagens enthält 7 Methioninreste, so daß bei der Bromcyanspaltung 8 sog. CB-Peptide erhalten wurden ($\alpha 1$ -CB 1 bis $\alpha 1$ -CB 8).

Die Reihenfolge der 4 kurzen CB-Peptide am Aminoende wurden von Piez u. Miller et al. (16) anhand von Aminosäureanalysen und Doppelpeptiden festgestellt (s. Abb. 2). Das schwierige Problem der Zuordnung der 4 langen CB-Peptide wurde von Rauterberg u. Kühn (17) mittels einer elektronenmikroskopischen Methode gelöst, die für alle größeren Kollagenpeptide (ab 50 bis 100 A.s.) anwendbar ist.

Die elektronenmikroskopische Zuordnung beruht auf folgenden charakteristischen Eigenschaften des Kollagens:

- 1) Werden saure native Kollagenlösungen gegen ATP dialysiert, so lagern sich die stäbchenförmigen Moleküle mit ihren Enden abschneidend parallel aneinander und bilden flächenförmige Segmente, die sog. Segment-Long-Spacing (SLS) (18). Wie aus Abb. 1 ersichtlich, kommen in dieser Anordnung gleiche Aminosäuren aller Kollagenmoleküle neben einander zu liegen. Werden nun diese Segmente mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat, die nur von basischen bzw. sauren Aminosäuren gebunden werden, angefärbt, so werden an den Stellen, an denen polare Aminosäuren angehäuft sind, dunkle Streifen senkrecht zur Molekülrichtung sichtbar. Anhäufungen von polaren Aminosäuren wie Gly, Ala, Pro und Hyp erscheinen als helle Streifen. (19)

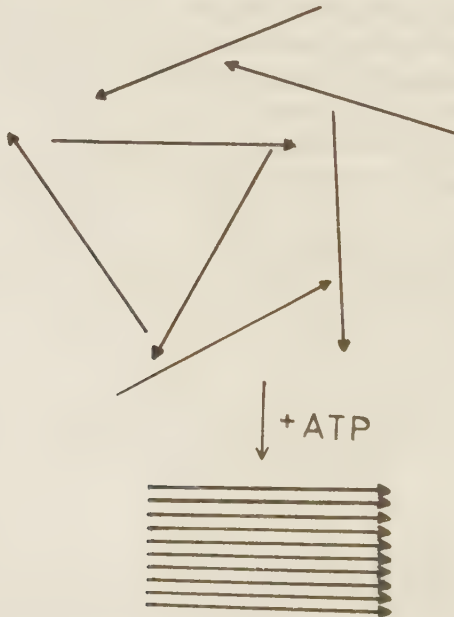


Abb. 1: Zusammenlagerung von gelösten Kollagenmolekülen unter dem Einfluß von ATP zu Long-Spacing-Segmenten (SLS)

In Abb. 2 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines positiv angefärbten Segmentes abgebildet. Die Länge und Richtung der Kollagenmoleküle ist durch den obersten Strich gekennzeichnet. Senkrecht dazu verlaufen die Querstreifen, die ein ungefähres Abbild der Aminosäuresequenz widerspiegeln.

2) Genau wie native Kollagenmoleküle können sich auch native Molekülfragmente unter dem Einfluß von ATP zu SLS-Fragmenten zusammenlagern. Voraussetzung ist die tripelhelikale Struktur der Molekülfragmente, die der Struktur nativer Kollagenmoleküle entsprechen muß.

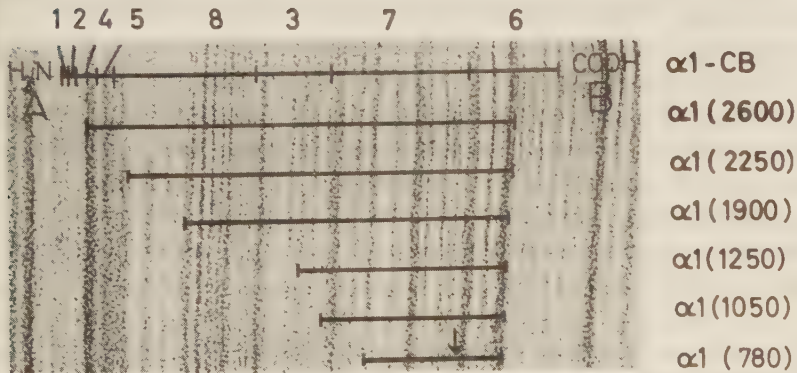


Abb. 2: Reihenfolge der 8 CB-Peptide der $\alpha 1$ -Kette und Position der Kollagenasefragmente nach M. Stark, in ein SLS von nativem Kalbshautkollagen eingezeichnet. Der Pfeil in $\alpha 1$ (780) markiert den Ort des Methioninrestes.

3) Durch einen Kunstgriff gelingt es, denaturierte $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten zu tripelhelikalen Kollagenmolekülen zu reformieren (Tkocz u. Kühn (34)), die dieselben SLS wie native Kollagenmoleküle bilden. In ähnlicher Weise können denaturierte Bruchstücke der α -Ketten zu tripelhelikalen Molekülbruchstücken re-

naturiert werden, die sich unter dem Einfluß von ATP ebenfalls parallel mit den Enden abschneidend aneinanderlagern, so daß SLS-Fragmente entstehen, die die gleiche Länge aufweisen wie die Bruchstücke der Einzelketten. Durch Vergleich des Querstreifungsmusters mit dem des gesamten Kollagens kann die Position des Kettenbruchstückes im Gesamtmolekül ermittelt werden.

Die Aminosäuresequenzen der 4 kurzen CB-Peptide vom Aminoende der $\alpha 1$ -Kette wurden von Bornstein, Kang und Piez ($\alpha 1$ -CB1 und $\alpha 1$ -CB2 aus Rattenhautkollagen) und Butler ($\alpha 1$ -CB4 und $\alpha 1$ -CB5) ermittelt (6, 22, 23). Damit ist die Sequenz der ersten 132 Aminosäurereste vom Aminoende der $\alpha 1$ -Kette aus Rattenhautkollagen bekannt. Der Sequenzaufbau stimmt im wesentlichen mit den Vorhersagen von Grassmann, Hannig et al. überein.

Bis auf das nichthelikale Aminoende von 11 Aminosäuren Länge befindet sich an jeder dritten Stelle ein Glycinrest; Hydroxyprolin wurde nur vor Glycin gefunden.

Das aminoternale CB-Bruchstück der $\alpha 2$ -Kette ($\alpha 2$ -CB1) mit 14 Aminosäuren wurde ebenfalls von Kang, Bornstein et al. sequenziert. (6)

Die Sequenzierung der 4 langen CB-Peptide $\alpha 1$ -CB3, -CB8, -CB7 und -CB6 bereitet wesentlich größere Schwierigkeiten als bei den kürzeren und ist erst in den Anfängen begriffen.

1966 entdeckte M. Stark eine weitere Methode, zu definierten Kollagenbruchstücken zu gelangen, und zwar durch Abbau von nativem Kollagen mit bakterieller Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* bei $4 - 10^{\circ}$. (24, 25)

Diese Kollagenase spaltet die apolaren Bereiche des Kollagens, und zwar bevorzugt zwischen folgenden Sequenzen:

$-\text{Gly-Pro-X} \downarrow \text{Gly-Y-Z-}$ und $-\text{Gly-X-Hyp} \downarrow \text{Gly-Y-Z-}$.

Aufgrund der tripelhelikalen Struktur wird das Kollagenmolekül von der Kollagenase nur sehr langsam von den Enden her abgebaut, an denen sich die α -Ketten im Gleichgewicht zwischen Helix- und Coillzustand befinden. An längeren polaren

Bereichen, in denen keine durch Kollagenase leicht spaltbaren Bindungen vorhanden sind, wird der Abbau so verlangsamt, daß sich Zwischenprodukte, nämlich Molekülfragmente verschiedener Länge, anreichern. M. Stark konnte bei Kalbshautkollagen 7 Molekülfragmente als SLS-Fragmente elektronenmikroskopisch nachweisen. Die elektronenmikroskopisch gemessenen Längen der SLS-Fragmente (und damit der Molekülfragmente) betrugen 2800, 2600, 2250, 1950, 1250, 1050 und 780 Å. Aus Abb. 2 ist zu erkennen, daß alle Molekülfragmente einen 300 Å vom Carboxylende entfernten starken dunklen Streifen als gemeinsames Carboxylende besitzen. Offenbar vermag die Kollagenase diesen polaren Bereich bei $4 - 10^{\circ}$ nicht zu überwinden, während der Abbau vom Aminoende her stufenweise fortschreitet.

Die 4 kürzeren Molekülfragmente mit Längen von 780, 1050, 1250 und 1950 Å konnten durch fraktionierte Ammonsulfatfällung isoliert werden. Durch Denaturierung bei $37 - 40^{\circ}$ zerfallen diese Molekülfragmente wie das gesamte Molekül in die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kettenfragmente. Bei der Auftrennung der Kettenfragmente an CM-Cellulose oder durch Diskelektrophorese stellte sich heraus, daß aus den $\alpha 1$ -Ketten zwei verschiedene ($\alpha 1$ - und $\alpha 1^{*}$ -) Kettenfragmente entstehen. Bei Rattenhautkollagen treten diese $\alpha 1^{*}$ -Ketten nicht auf. Wie spätere Untersuchungen von F. Rexrodt (26) ergaben, unterscheiden sich die $\alpha 1^{*}$ -Kettenfragmente von den $\alpha 1$ -Kettenfragmenten nur dadurch, daß sie am Carboxylende sieben Aminosäuren (Gly-Ileu-Hylys-Gly-His-Arg-Gly) länger sind. Da die $\alpha 1^{*}$ -Kettenfragmente also 3 basische Aminosäuren mehr als die $\alpha 1$ -K.Fragm. besitzen, erklärt sich deren unterschiedliches elektrophoretisches und chromatographisches Verhalten. (Siehe auch Ergebnisse 2.1.1.3.)

Der Vergleich der durch Kollagenaseabbau erhaltenen $\alpha 1$ -Kettenfragmente mit den CB-Peptiden der $\alpha 1$ -Kette in Abb. 2 zeigt, daß die $\alpha 1$ -Kettenfragmente einen oder mehrere Methioninreste enthalten. Die Nachspaltung der Kettenfragmente mit Bromcyan sollte daher zu kürzeren Kollagenpeptiden führen, die die Aufklärung der Aminosäuresequenz des Kollagens wesentlich erleichtern sollten.

1.2. AUFGABENSTELLUNG

Die durch den Kollagenaseabbau erhaltenen Kettenfragmente sind für die Aufklärung der Primärstruktur zu lang. Das kürzeste Kettenfragment der $\alpha 1$ -Kette, das sog. $\alpha 1(780)$, weist immer noch eine Länge von 280 Aminosäureresten auf. Da $\alpha 1(780)$ jedoch einen Methioninrest enthält, sollte es möglich sein, durch Nachspaltung mit Bromcyan zwei kürzere Spaltprodukte zu erhalten.

Da die Positionen der Methioninreste entlang der $\alpha 1$ -Kette bekannt sind, können Länge und Position der zu erwartenden Spaltprodukte vorhergesagt werden. In Abb. 2 ist die Position des Methionins in $\alpha 1(780)$ durch einen Pfeil gekennzeichnet. Daraus ist ersichtlich, daß das aminoendständige CB-Peptid von $\alpha 1(780)$, das sog. $\alpha 1(780)$ -CB N, ca. 520 Å bzw. 180 Aminosäurereste lang sein sollte. Das carboxylendständige CB-Peptid, das sog. $\alpha 1(780)$ -CB C, sollte eine Länge von ca. 300 Å bzw. 100 Aminosäureresten aufweisen. (Aufgrund von Röntgenstrukturuntersuchungen nimmt ein Aminosäurerest in der Tripelhelix eine Länge von 2,91 Å ein).

Die Aufgabe bestand darin, das Kettenfragment $\alpha 1(780)$ mit Bromcyan zu spalten und die entstehenden Bruchstücke zu untersuchen. Ferner sollte das C-terminale Peptid, das aufgrund seiner ausgeprägten Querstreifung (s. Abb. 2) eine interessante Aminosäuresequenz erwarten ließ, im präparativen Maßstab isoliert und sequenziert werden.

2. ERGEBNISSE

2.1. Teil: Die Bromcyanspaltung des Kettenfragments $\alpha 1(780)$

2.1.1. Präparative Darstellung von $\alpha 1(780)$

2.1.1.1. Kollagenaseabbau

Um größere Mengen der Kollagenasefragmente zu erhalten, mußte zunächst die Methode des Kollagenaseabbaus von nativem Kalbs-hautkollagen, die M. Stark u. Kühn (25) in analytischem Maßstab entwickelt hatten, nach präparativen Gesichtspunkten erweitert werden.

Durch Dauer und Intensität der Kollagenaseeinwirkung kann das Verhältnis der Ausbeuten an langen und kurzen Molekülfragmenten beeinflusst werden. Ein Maß für den Grad des Abbaus ist die optische Drehung: Native Kollagenlösungen haben einen spez. Drehwert von $(\alpha)_{405} = -1000^{\circ}$; vollständig abgebaute denaturierte Kollagenpeptide haben einen Drehwert von $(\alpha)_{405} = -230^{\circ}$. Bei $(\alpha)_{405} = -500^{\circ}$, d. h. bei $\frac{500 - 230}{1000 - 230} \cdot 100 = 35\%$ intakter Tripelhelix ist die Ausbeute an 780-Fragment am größten. Dieser Drehwert wurde bei einem Enzym: Kollagen-verhältnis = 1:10 (Gew. verh.) nach 24-stündigem Abbau erreicht.

Aus der Diskelektrophorese des Abbaugemisches (Abb. 3a) ist das Verhältnis der Ausbeuten der einzelnen Molekülfragmente ersichtlich. Je drei Banden entsprechen den $\alpha 1$ -, $\alpha 1^*$ - und $\alpha 2$ -Kettenfragmenten eines Molekülfragmentes.

2.1.1.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Molekülfragmente wurden durch drei Ammoniumsulfatfällungen verschiedener Konzentration fraktioniert. In Abb. 3b-d sind die Diskelektropherogramme der Fraktionen abgebildet. Fraktion I (15 % gesättigt an Ammoniumsulfat) enthält die langen Molekülfragmente 2600, 1950 und 1250 Å. Fraktion II (21 % ges. an Amm.sulf.) besteht hauptsächlich aus den Molekülfragmenten 1250 und Anteilen an 1050- und 780-Fragment. Fraktion III enthält vorwiegend das gewünschte Fragment 780. Die Ausbeuten der Fraktionen wurden durch Messung des Drehwertes und des Volumens der Lösung vor und nach jeder Ammoniumsulfatfällung berechnet. Dabei wurde angenommen, daß eine Lösung von tripelhelikalen Molekülfragmenten ebenso wie eine native Kollagenlösung einen spez. Drehwert von $(\alpha)_{405} = -1000^{\circ}$ besitzt. (Ein Drehwert von -1° bei 405nm bedeutet also bei einer Küvettenlänge von 10 cm eine Konzentration von 1 mg/ml nativen Kollagens bzw. tripelhelikaler Kollagenbruchstücke.)

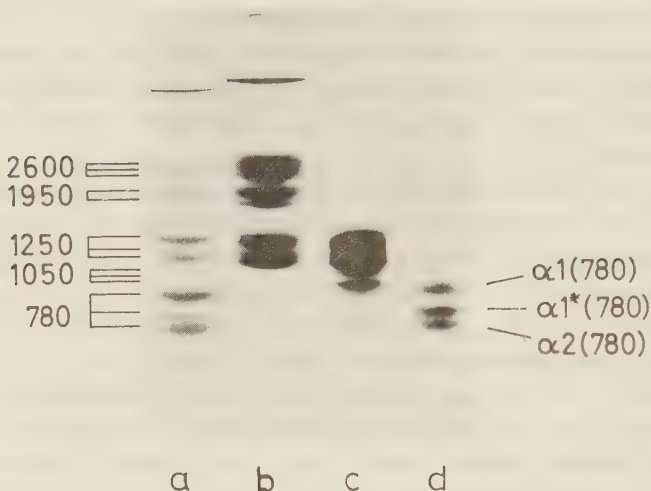


Abb. 3: Diskelektrophorese des Kollagenaseabbaugemisches von Kalbshautkollagen (a), sowie der Ammoniumsulfatfraktionen I (b), Ausbeute 13 % des Ausgangsmaterials, Fraktion II (c), Ausbeute 19 % des Ausgangsmaterials u. Fraktion III (d), Ausbeute 10 % des Ausgangsmaterials.

2.1.1.3. Trennung der Kettenfragmente durch CM-Cellulosechromatographie

Abb. 4 zeigt die Auftrennung der denaturierten Fraktion III an CM-Cellulose bei pH 4,8. Es sind drei Hauptfraktionen zu erkennen, die die $\alpha 1$ -, $\alpha 1^*$ - und $\alpha 2$ -Kettenfragmente des 780 Å-Molekülfragmentes enthalten. Davon gut abgetrennt sind geringe Beimengungen der 1050-Kettenfragmente. Die mit X bezeichnete Fraktion hat eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie $\alpha 1(780)$. Untersuchungen von Rexrodt (27) haben jedoch gezeigt, daß es sich dabei um ein Peptid aus dem Aminoende des Moleküls handelt. Die Identifizierung der Fraktionen erfolgte durch Ver-

gleich der Laufstrecken der einzelnen Fraktionen mit denen der Fraktion III des Abbaugemisches in der Diskelektrophorese. Aus Abb. 5 ist ersichtlich, daß alle Peaks außer $\alpha 2(780)$ noch nicht einheitlich waren. $\alpha 1(780)$ konnte durch Rechromatographie an CM-Cellulose bei pH 3.6 rein erhalten werden. Zur Nachspaltung mit Bromcyan war jedoch keine Rechromatographie notwendig.

Aus 10 g Kalbskollagen wurden auf diese Weise 150 mg $\alpha 1(780)$ gewonnen.

2.1.1.4. Aminosäureanalysen

In Tab. 1 sind die Aminosäurezusammensetzungen von $\alpha 1$ -, $\alpha 1^*$ - und $\alpha 2(780)$ wiedergegeben. Die dabei zugrundegelegten Kettenlängen von 285 Aminosäureresten für $\alpha 1(780)$ bzw. 290 A.s.reste für $\alpha 1^*(780)$ und $\alpha 2(780)$ wurden zunächst aus der elektronenoptisch gemessenen Länge der SLS-Fragmente (s. Abb. 9) berechnet, wobei pro Aminosäurerest eine Länge von $2,91 \text{ \AA}$ entlang der Helixachse angenommen wurde. Die genauen Werte von $\alpha 1$ - und $\alpha 1^*(780)$ wurden aus den Molekulargewichten ihrer CB-Peptide ermittelt (s. 2.1.2.3.).

Wie aus Tab. 1 zu ersehen ist, unterscheiden sich die Aminosäurezusammensetzungen $\alpha 1(780)$ und $\alpha 1^*(780)$ nicht wesentlich voneinander; $\alpha 1^*(780)$ enthält ein Histidin, ein Hydroxylysin, ein Arginin und ein Isoleucin mehr als $\alpha 1(780)$, wodurch sich das unterschiedliche chromatographische Verhalten erklärt. Die Zusammensetzung von $\alpha 2(780)$ weicht dagegen stärker von den $\alpha 1$ -Kettenfragmenten ab. So enthält es kein Methionin, ist also nicht mit BrCN spaltbar, dagegen enthält es Tyrosin.

M. Stark hatte ursprünglich für die $780\text{-\AA}$ Kettenfragmente eine Länge von 270 Aminosäureresten pro Kette, entsprechend $780 \text{ \AA}$, angenommen. Aufgrund der neueren Ergebnisse mußte die Kettenlänge auf 285 Aminosäurereste für $\alpha 1(780)$, entsprechend $825 \text{ \AA}$, erhöht werden. Die Bezeichnung $\alpha 1(780)$ oder $\alpha 2(780)$ wurde aber aus praktischen Gründen beibehalten.

2.1.2. Die Bromcyanspaltung von $\alpha 1(780)$ und die Isolierung der CB-Peptide $\alpha 1(780)$ -CB N und $\alpha 1(780)$ -CB C

2.1.2.1. Trennung der CB-Peptide an CM-Cellulose

$\alpha 1(780)$ wurde mit BrCN gespalten, und das entsalzte Reaktionsgemisch wurde durch Chromatographie an CM-Cellulose bei pH 3,6 aufgetrennt. (Abb. 6) Es traten 4 Fraktionen auf, 2 Hauptfraktionen a und b, und 2 Nebenfraktionen c und d. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe der Aminosäureanalyse, der Diskelektrophorese und der elektronenmikroskopischen Zuordnung.

Aus der Diskelektrophorese (Abb. 7) ist ersichtlich, daß die Fraktionen a (Nr. 4) und b (Nr. 3) Spaltprodukte darstellen, während es sich bei Fraktion c (Nr. 5) um ungespaltenes Ausgangsmaterial handeln muß, wie der Vergleich mit der Laufstrecke der Ausgangssubstanz $\alpha 1(780)$ (Abb. 7, Nr. 1) zeigt. Fraktionen a und b sind bereits ohne Rechromatographie rein. Fraktion d erwies sich nach der Aminosäureanalyse als Verunreinigung.

2.1.2.3. Identifizierung der CB-Peptide aufgrund der Aminosäureanalyse

Da bei der Bromcyanspaltung die Peptidketten am Carboxylende des Methionins gespalten werden, wobei das Methionin in Homoserin umgewandelt wird, muß das Homoserin enthaltende Spaltprodukt das aminoendständige Peptid sein. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, enthält Peak b ein Homoserin, er stellt also das N-terminale CB-Peptid von $\alpha 1(780)$, das sog. $\alpha 1(780)$ -CB N, dar.

Homoserin liegt nach der Bromcyanspaltung z.T. in der Lactonform, z.T. in der Säureform vor. In Fraktion b (Abb. 6) liegt die Hauptmenge von $\alpha 1(780)$ -CB N in der Lactonform vor; die Schulter vor Peak b enthält CB N mit Homoserin in der Säureform.

(Die Aminosäurehydrolysate wurden vor der Analyse mit 2%-Piperidinlösung behandelt, um das Homoserinlacton in die Säure-

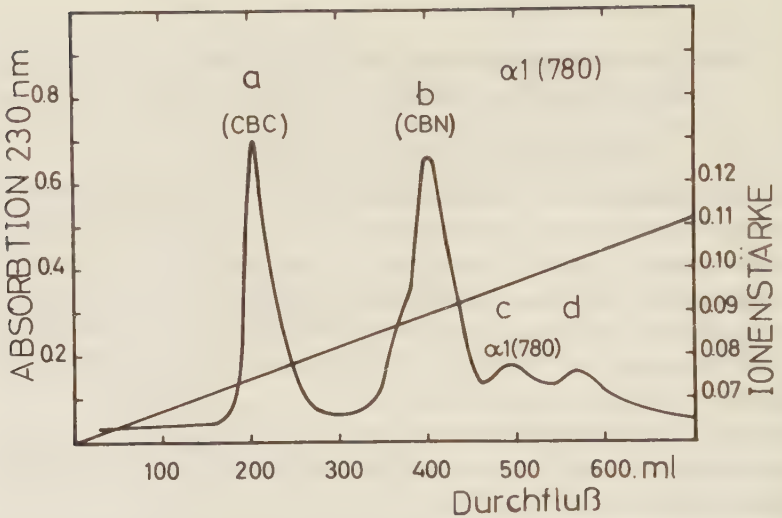


Abb. 6: Chromatographie der Bromcyanspaltprodukte von $\alpha 1(780)$ an CM-Cellulose bei pH 3,6. Elutionsbedingungen: Linearer Gradient von 500 ml 0,02 m Natriumcitrat/ 0,04 m NaCl, pH 3,6, bis 0,02 m Natriumcitrat/ 0,14 m NaCl, pH 3,6, bei 40°.

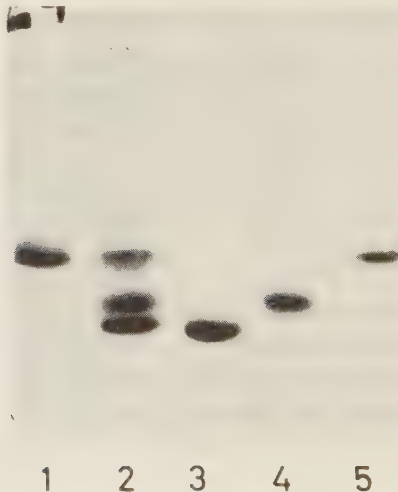


Abb. 7: Diskelektrophorese von $\alpha 1(780)$ und dessen BrCN-Spaltprodukten: (1) $\alpha 1(780)$; (2) BrCN-Spaltgemisch; (3) Fraktion b ($\alpha 1(780)$ -CB N); (4) Fraktion a ($\alpha 1(780)$ -CB C); (5) Fraktion c (ungespaltenes $\alpha 1(780)$).

form überzuführen.)

Fraktion a, die kein Homoserin enthält, muß demnach das carboxylendständige Peptid von a1(780), das sog. a1(780)-CB C, sein.

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung von a1(780), a1*(780) und a2(780) und den beiden CB-Peptiden von a1(780)

	a1(780)	a1*(780)	a2(780)	a1(780) CB N (b)	a1(780) CB C(a)	a1(780) CBN+CBC
-Hydroxyprolin	23	23	25	16	5(5,3)	21
sparaginsäure	10	11	17	6(6,5)	5(5,1)	11
hreonin	6(6,0)	6(6,1)	8(7,6)	3(3,1)	3(2,9)	6
erin	10	9(8,8)	10	5(4,8)	4(3,1)*	9
omoserin	-	-	-	1(0,9)	-	1
lutaminsäure	22	22	17	13	9(9,4)	22
rolin	40	40	35	23	17	40
lycin	96	97	97	63	35	98
lanin	35	35	25	23	13	36
alin	7(6,6)	7(7,1)	13	5(5,1)	2(2,4)	7
ethionin	1(0,8)	1(1,0)	-	-	-	-
soleucin	3(2,9)	4(3,9)	3(3,0)	2(2,2)	1(1,0)	3
eucin	3(3,2)	3(3,2)	8(7,7)	2(2,3)	1(1,3)	3
yrosin	-	-	1(1,0)	-	-	-
henylalanin	2(2,2)	2(2,2)	3(3,2)	2(2,2)	-	2
ydroxylysin	2(1,9)	3(2,8)	4(4,0)	1(1,3)	1(1,0)	2
istidin	-	1(0,9)	2(2,0)	-	-	-
ysin	9(9,1)	9(8,8)	5(5,2)	7(6,6)	2(2,0)	9
rginin	16	17	17	9(8,6)	7(7,4)	16
umme	285	290	290	180	105	285

Dieser Serinwert wurde auf Grund der Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide auf 4 aufgerundet.

a1(780)-CB N und '-CB C zeigen typische Kollagenamino-säure-zusammensetzung. Die Summe der Analysenwerte stimmt innerhalb der Fehlergrenze mit den Werten von a1(780) überein, besonders bei den in geringeren Mengen vorkommenden Aminosäuren.

2.1.2.4. Molekulargewichte

Die ungefähren Molekulargewichte der CB-Peptide von $\alpha 1(780)$ wurden auf 2 Wegen ermittelt:

1) Aus der Länge der SLS-Fragmente: (s. Abb. 9)

Die elektronenoptisch gemessene Länge von $\alpha 1(780)$ -CB N betrug $520 \text{ \AA} \pm 30 \text{ \AA}$; das entspricht einer Aminosäurezahl von 180 ± 10 Resten pro Kette.

Die Länge von $\alpha 1(780)$ -CB C im SLS-Fragment beträgt $300 \pm 30 \text{ \AA}$; das entspricht 100 ± 10 Aminosäureresten pro Kette.

2) Nach Yphantis in der Ultrazentrifuge (28)

Auf diesem Wege wurde nur das Molgewicht von $\alpha 1(780)$ -CB N mit 18500 bestimmt. Das entspricht bei einem durchschnittlichen Molgew. von 91 pro Aminosäurerest im Kollagen einer Kettenlänge von 200 Resten.

Die genauen Molekulargewichte wurden aus der Aminosäureanalyse berechnet, indem die Mikromolwerte der in den geringsten Mengen vorkommenden Aminosäuren, wie Homoserin in $\alpha 1(780)$ -CB N und Leucin in $\alpha 1(780)$ -CB C, als Einheit genommen wurden (s.a. Experiment.Teil). Die dadurch erhaltenen Werte stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen mit den Ergebnissen der UZ-Molekulargewichtsbestimmung und elektronenmikroskopischen Längenmessung überein.

Molekulargewichte von $\alpha 1(780)$, $\alpha 1(780)$ -CB N
und $\alpha 1(780)$ -CB C

	$\alpha 1(780)$	$\alpha 1(780)$ -CB N	$\alpha 1(780)$ -CB C
EM	28000	18000	10000
UZ	-	18500	-
Am.An.	25900	16335	9571

2.1.2.5. Elektronenmikroskopische Zuordnung

Zur weiteren Identifizierung der CB-Peptide von $\alpha 1(780)$ wurden diese renaturiert, durch Dialyse gegen ATP als SLS-Fragmente gefällt und angefärbt. Das Querstreifungsmuster der ausgefällten SLS-Fragmente wurde im Elektronenmikroskop aufgenommen und mit dem Querstreifungsmuster des gesamten Kollagenmoleküls verglichen.

Renaturierung:

Abb. 8 zeigt das Renaturierungsverhalten von $\alpha 1(780)$ und dessen beiden CB-Peptiden anhand des Anstieges der negativen opt. Rotation. Bei etwa gleichen Proteinkonzentrationen von 0.08 mg/ml zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Renaturierungsgeschwindigkeit und -temperatur von der Kettenlänge. Während $\alpha 1(780)$ und $\alpha 1(780)$ -CB N nach Denaturierung bei 36° schon bei $+15^{\circ}$ C genügend schnell renaturieren, renaturiert $\alpha 1(780)$ -CB C erst bei $+10^{\circ}$ mit merklicher Geschwindigkeit. Wegen unvollständigen Renaturierungen wird der ursprüngliche Drehwert von $(\alpha)_{405}^{\circ} = -1000^{\circ}$ nicht mehr erreicht.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen:

In Abb. 9 sind die el.mikr. Aufnahmen der SLS-Fragmente abgebildet. (a) zeigt das SLS-Fragment von renaturiertem $\alpha 1(780)$ -CB C, (b) ein SLS von gesamtem Kalbs-SLK, und (c) ein SLS-Fragment von $\alpha 1(780)$ -CB N. Die Pfeilspitzen zeigen die jeweiligen Molekülenden an. Der durchgezogene Strich in (b) deutet die Position von $\alpha 1(780)$ an, während die senkrecht dazu verlaufende gestrichelte Linie die Lage des Methioninrestes zwischen $\alpha 1$ -CB 6 und $\alpha 1$ -CB 7 markiert. Der Vergleich der Querstreifungsmuster bestätigt, daß es sich bei $\alpha 1(780)$ -CB C um das C-terminale und bei $\alpha 1(780)$ -CB N um das N-terminale Bruchstück von $\alpha 1(780)$ handelt.

Die Querstreifung von $\alpha 1(780)$ -CB C stimmt nicht ganz genau mit dem entsprechenden Bereich des Segmentes aus nativem Kollagen überein, da sich in diesem Segment die renaturierten Moleküle ($\alpha 1(780)$ -CB C)₃ wahrscheinlich antiparallel zusammengelagert haben, so daß sich ein symmetrisches Querstreifungsmuster ergibt.

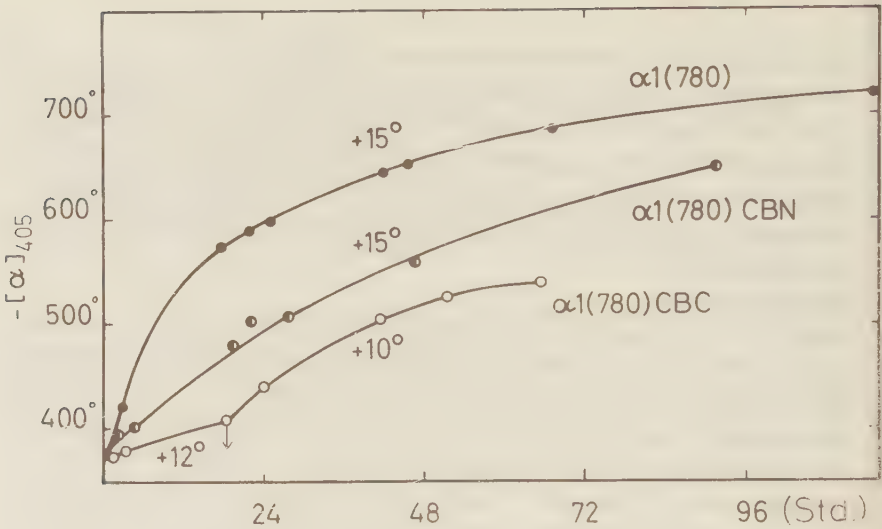


Abb. 8: Renaturierungsverhalten von $\alpha 1(780)$ und dessen beiden CB-Peptiden in Citratpuffer, pH 3,7, bei $+15$, 12 und 10° , gemessen anhand des Anstieges der neg.opt. Drehung.

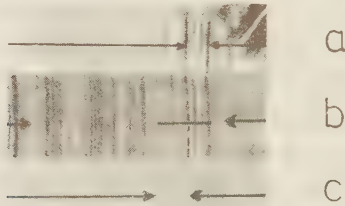


Abb. 9: Long-Spacing-Segment-Fragmente von $\alpha 1(780)$ -CB C (a) und $\alpha 1(780)$ -CB N (c), verglichen mit einem SLS von nativem Kalbs-SLK (b). Angefärbt mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat; die Pfeile zeigen die Molekülen an.

2.1.2.6. Fingerprints

Abb. 10 c zeigt die 2-dimensionale Auftrennung eines Trypsin-spaltgemisches von $\alpha 1(780)$ durch Hochspannungspapier-elektrophorese und Papierchromatographie. Aufgrund des Basengehaltes von $\alpha 1(780)$ (16 Arg und 9 Lys) können maximal 26 tryptische Peptide erwartet werden. Leider häufen sich jedoch wegen der monotonen Kollagensequenz viele ähnliche Peptide im neutralen Bereich und werden nicht getrennt. Abb. 10 a und b zeigen die Fingerprints von $\alpha 1(780)$ -CB C und -CB N. Im sauren und basischen Bereich der Fingerprints ist besonders deutlich sichtbar, daß die Summe der tryptischen Peptide aus den beiden CB-Peptiden mit der Zahl der tryptischen Peptide von $\alpha 1(780)$ übereinstimmt.

Zusammenfassung des 1. Teils:

Durch Bromcyanspaltung des Kettenfragments $\alpha 1(780)$ wurden 2 CB-Peptide, $\alpha 1(780)$ -CB N und $\alpha 1(780)$ -CB C, erhalten, die durch CM-Cellulosechromatographie getrennt werden konnten. Sie wurden durch Diskelektrophorese, Aminosäureanalyse und elektronenmikroskopische Zuordnung identifiziert. Das aminoendständige Bruchstück enthält 180 Aminosäurereste, darunter ein Homoserin; das carboxylendständige Bruchstück ist 105 Aminosäurereste lang. Beide Peptide konnten zu tripeptidhelikalen Molekülen renaturiert werden und als SLS-Fragmente im Elektronenmikroskop der gesamten $\alpha 1$ -Kette zugeordnet werden. Die Spaltung verlief genau an der vorhergesagten Stelle. Die erhaltenen CB-Peptide weisen die erwartete Länge und Position auf.

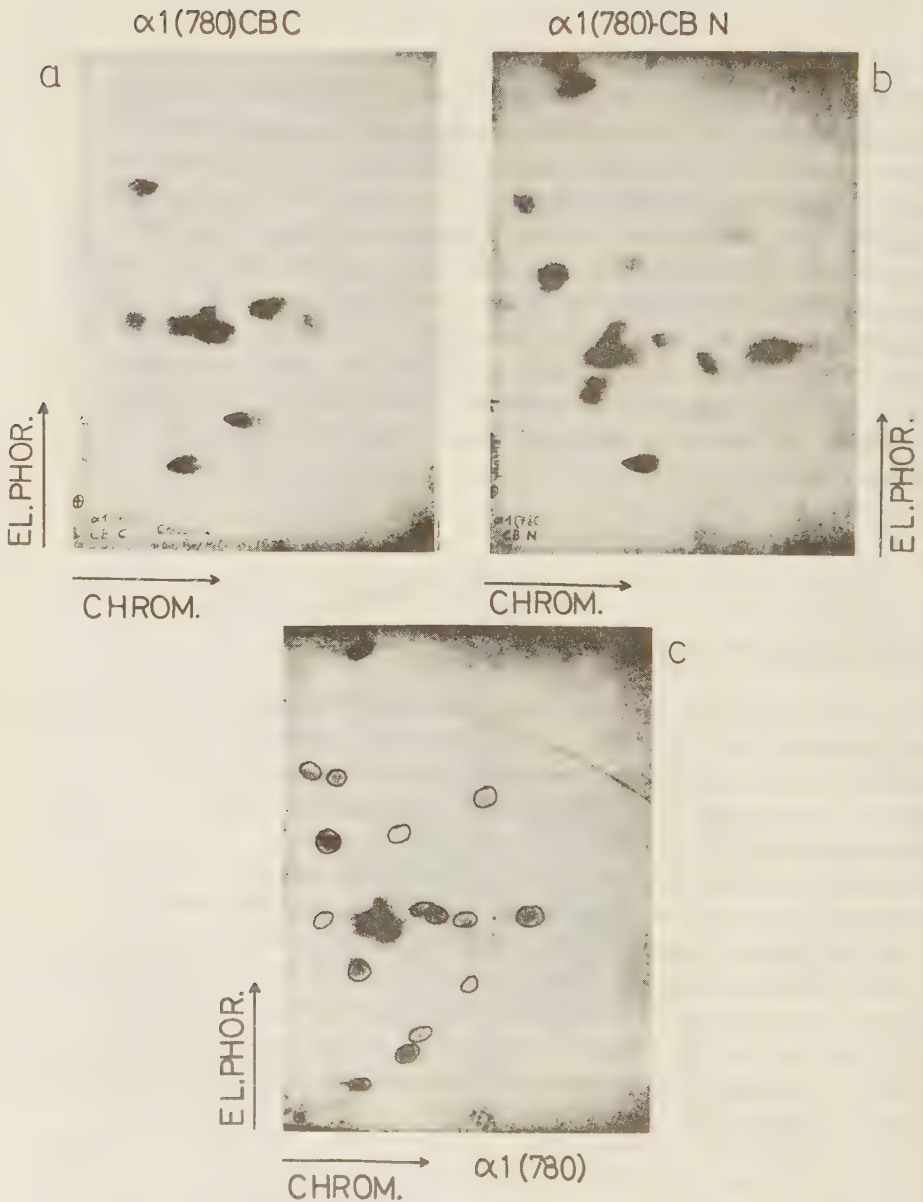


Abb. 10: Fingerprints der tryptischen Peptide von $\alpha 1(780)$ und dessen beiden CB-Peptiden. Elektrophoresebedingungen: 100 V/cm in 0,25 m Pyridinacetat, pH 5,4; Chromatographie: 14 Std. absteigend in Pyridin-n-Butanol-Wasser (35:35:30).

2.2. Die Aminosäuresequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C

$\alpha 1(780)$ -CB C wurde in größeren Mengen (ca. 500 mg) wie oben beschrieben hergestellt und noch einmal durch Gelchromatographie an Sephadex G-100 gereinigt. (26)

Zur Bestimmung der Sequenz wurde es mit Trypsin gespalten; 9 tryptische Peptide wurden isoliert und durch Edmanabbau sequenziert. Die längeren tryptischen Peptide wurden mit Kollagenase nachgespalten.

Die Reihenfolge der Peptide wurde von P. Wendt (31) durch Spaltung von $\alpha 1(780)$ -CB C mit Thermolysin und Isolierung von überlappenden Peptiden festgestellt.

2.2.1. Isolierung und Reinigung der tryptischen Peptide

2.2.1.1. Trypsinspaltung

$\alpha 1(780)$ -CB C enthält 10 basische Aminosäuren, davon ein Hydroxylysin, 2 Lysin- und 7 Argininreste. Bei der Trypsinspaltung sollten also 11 Peptide entstehen, vorausgesetzt, daß Trypsin auch an Hydroxylysin spaltet. Im Fingerprint (Abb. 10 a) waren nur 9 Peptide zu unterscheiden, darunter ein basisches, 6 neutrale und 2 saure Peptide.

2.2.1.2. Dowex 1X2-Chromatographie der tryptischen Peptide

Abb. 11 zeigt die Auftrennung des Trypsinspaltgemisches an Dowex 1X2. Es sind 9 Fraktionen zu erkennen, die sich in der Papierelektrophorese und -chromatographie allerdings als nicht einheitlich erwiesen. Eine Reinigung aller Fraktionen durch präparative Papierelektrophorese, Gelchromatographie oder Kationenaustauscherchromatographie an Aminex A 6 war daher notwendig.

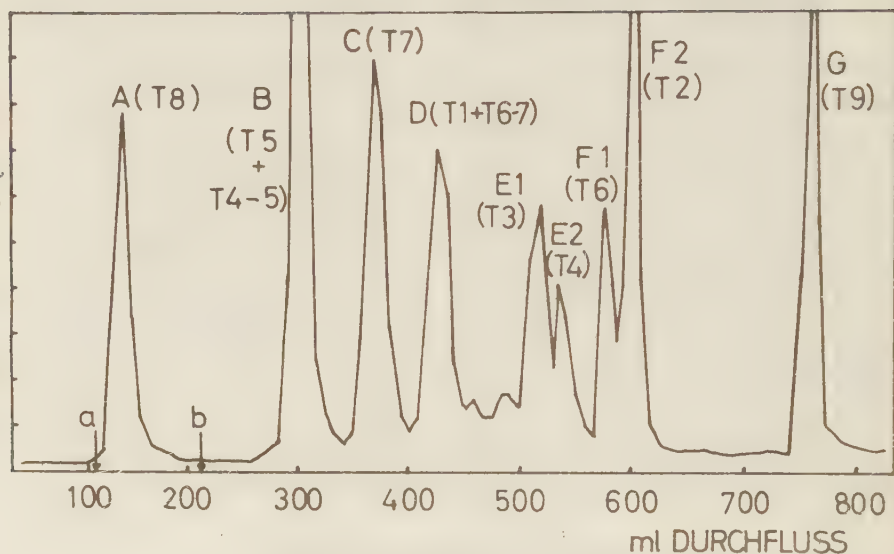


Abb. 11: Chromatographie der tryptischen Peptide von $\alpha 1(780)$ -CB C an Dowex 1X2 bei 45° . Elutionsbedingungen: 1.1% Colli-
dinacetat pH 8,5 (100 ml) 2. (bei a) 1%Coll.-1% Pyridin-
acetat pH 7,5 (100 ml) 3. (bei b) linearer Gradient von
600 ml 1% Coll.-1% Pyridinacetat pH 7,5 und 600 ml 2 n
Essigsäure.

2.2.1.3. Rechromatographien an Aminex A6

Fraktion A ergab bei der Rechromatographie an Aminex A 6 einen Hauptpeak und einen Nebenpeak (Abb. 12). Der Hauptpeak erwies sich aufgrund seiner Aminosäureanalyse als einheitliches Nonapeptid. Da es aufgrund seiner elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit als basisches Peptid bezeichnet werden kann, liegt die Glutaminsäure wahrscheinlich in der amidierten Form vor.

Das Peptid wurde der Übersichtlichkeit halber schon im Hinblick auf die später festgestellte Reihenfolge der Peptide mit T 8 bezeichnet.

Fraktion C ergab an Aminex A 6 einen Vorpeak, der nur aus Glycin bestand, und einen Hauptpeak, der sich aufgrund der Aminosäureanalyse als reines 18 Aminosäuren enthaltendes Peptid erwies (T 7). Da das freie Glycin in wesentlich geringerer Molarität auftrat als die übrigen tryptischen Peptide, kann es als eine Verunreinigung angesehen werden. (Abb. 13)

Fraktion D wurde ebenfalls an Aminex A 6 rechromatographiert (Abb. 14). Die erste Fraktion X ist der Aminosäureanalyse nach eine höhermolekulare Verunreinigung, die nicht weiter untersucht wurde. Die anderen beiden Fraktionen erwiesen sich als reine homogene Peptide (T 1 und T 6-7). Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß T 6-7 alle Aminosäuren von T 7 enthält, und außerdem je einen Glycin, Serin-, Asparaginsäure- und Argininrest. Letzteres ist die Aminosäurezusammensetzung von T 6 (s. Tab. 2). T 6-7 ist also ein tryptisches Doppelpeptid mit einer teilweise trypsinresistenten Arg-X- oder Lys-X-Bindung.

Ebenso ergaben die Fraktionen E1, E2, F1 und F2 bei der Rechromatographie an Aminex A 6 je einheitliches Peptid (T 3, T 4, T 6 und T 1).

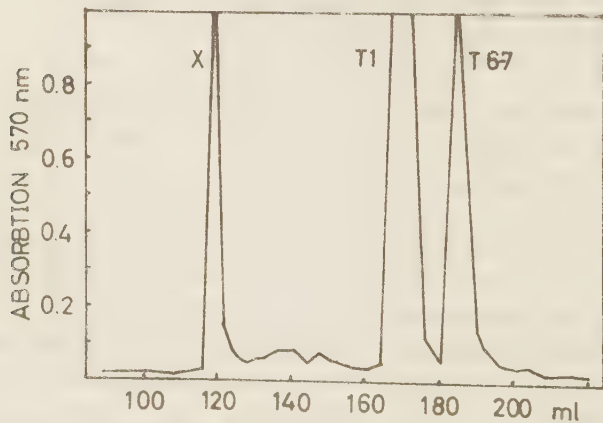
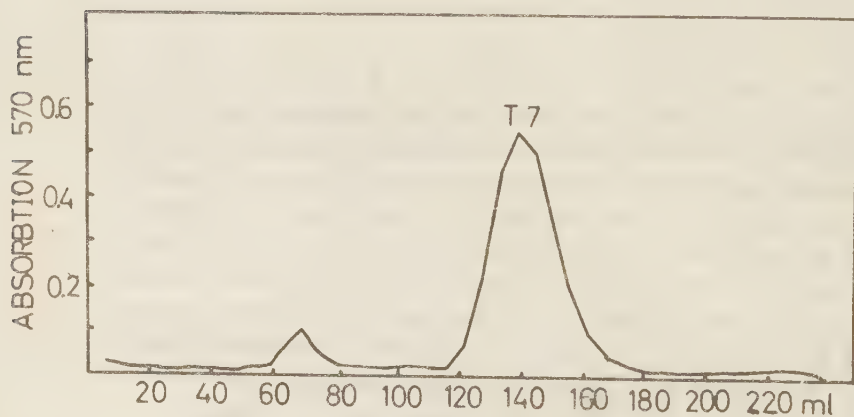
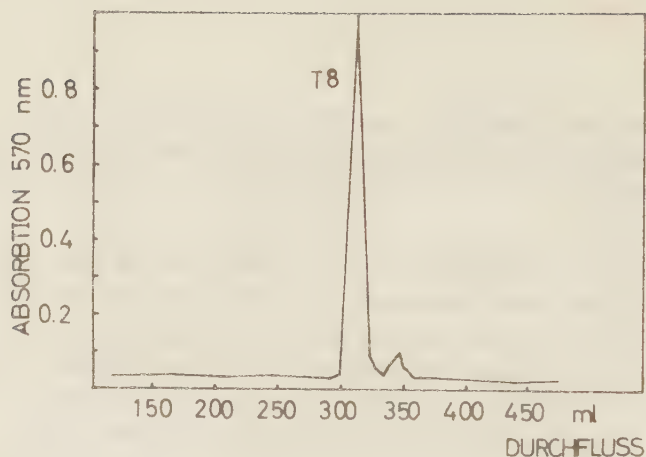


Abb. 12 - 14: Rechromatographien der Dowex 1X2-Fractionen A (Abb. 12), C (Abb. 13) und D (Abb. 14) an Aminex A 6 bei 50°. Elutionsbedingungen: 1. 150 ml 0,1 m Pyridinformiat pH 3,1; 2. Linearer Gradient von 350 ml 0,1 m Pyridinformiat pH 3,1 und 350 ml 2,23 m Pyridinacetat pH 5,4.

2.2.1.4. Rechromatographie von Fraktion G (T 9)

Fraktion G enthielt ein saures Peptid, das sich an Aminex nicht gut rechromatographieren ließ. Es wurde daher an Biogel P4 gereinigt. T 9 enthält zwei basische Aminosäuren, Hydroxylysin und Arginin. Ein tryptisches Peptid, das nur Hydroxylysin enthält, wurde nicht gefunden, das heißt, das in T 9 entweder eine Hyllys-X- oder eine Arg-X-Bindung nicht gespalten wurde.

2.2.1.5. Reinigung von Fraktion B

Fraktion B zeigte in der Papierelektrophorese 2 Banden, Ba und Bb. Sie wurden durch präparative Papierelektrophorese getrennt und analysiert. Ba erwies sich als ein 26 Aminosäuren langes Peptid (T 5); Bb enthielt drei Aminosäuren, nämlich Glycin, Arginin und Asparaginsäure, mehr als Ba. Es handelt sich also um das tryptische Doppelpeptid T 4-5. T 5 konnte durch Rechromatographie an Sephadex G 50 s weiter gereinigt werden.

2.2.1.6. Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide

In Tabelle 2 sind die Aminosäureanalysen der gefundenen tryptischen Peptide wiedergegeben und mit der Analyse von $\alpha 1(780)$ -CBC verglichen. Die Summen der Analysenwerte aller Peptide stimmen gut mit der Analyse von $\alpha 1(780)$ -CBC überein, es ist also anzunehmen, daß mit T 1 bis T 9 alle tryptischen Peptide von $\alpha 1(780)$ -CB C erfaßt sind. Daß anstelle der erwarteten 11 Peptide nur neun gefunden wurden, hat zwei Gründe:

- 1) T 9 enthält zwei basische Aminosäuren.
- 2) Offensichtlich wird das Carboxylende von $\alpha 1(780)$ -CB C von einer basischen Aminosäure eingenommen, denn es wurde kein Peptid ohne basische Aminosäure gefunden.

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide von a1(780)-CB C

	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	Summe	a1(780) CB C
Myo	1(1.2)	1(1.3)	1(0.9)	-	2(2.1)	-	-	-	-	5(5.5)	5(5.4)
Asp	-	-	1(1.0)	1(1.1)	-	1(0.9)	-	-	2(2.0)	5(5.0)	5(5.1)
Thr	-	-	-	-	1(0.7)	-	1(1.0)	-	1(0.7)	3	3(2.7)
Ser	1(0.7)	1(0.9)	1(0.8)	-	-	1(0.6)	-	-	-	4	4(3.1)
Glu	1(1.0)	2(2.2)	-	-	1(0.9)	-	1(0.9)	1(1.0)	3(3.0)	9	9(9.3)
Pro	3(2.8)	1(0.7)	-	-	6(6.0)	-	4(4.0)	3(3.0)	-	16.5	17
Gly	5(4.8)	4(3.9)	2(2.0)	1(1.0)	9(8.6)	1(1.0)	6(6.0)	3(3.0)	4(4.1)	35	35
Ala	1(0.9)	2(2.2)	1(1.0)	-	5(4.9)	-	3(3.1)	1(1.0)	-	13	13
Val	-	-	-	-	1(1.0)	-	1(1.0)	-	-	2	2(2.1)
Ile	-	-	-	-	-	-	1(1.0)	-	-	1	1(1.0)
Leu	1(1.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1(1.2)
Hyl	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1.1)	1	1(1.0)
Lys	-	-	1(0.9)	-	1(0.9)	-	-	-	-	2	2(2.0)
Arg	1(1.0)	1(1.0)	-	1(1.0)	-	1(1.0)	1(1.0)	1(1.0)	1(1.1)	7	7(7.4)
14	14	12	7	3	26	4	18	9	12	105	105

Durch Hydrazinolyse von $\alpha 1(780)$ -CB C, bei der F. Rexrodt Arginin fand, wurde diese Vermutung bestätigt. (26)

2.2.1.7. Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Doppelpeptide

In Tabelle 3 sind die Aminosäureanalysen der Peptide T 4-5 und T 6-7 wiedergegeben. Bis auf die Glycinwerte stimmen die Summen der Werte von T 4 und T 5 gut mit der Zusammensetzung von T 4-5 überein.

Auch die Werte von T 6 und T 7 lassen sich bis auf Glycin und Prolin zu T 6-7 addieren.

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen
Doppelpeptide T 4-5 und T 6-7

	T 4-5	T 4	T 5	T 6-7	T 6	T 7
Hyp	2(1.8)	-	2(2.1)	-	-	-
Asp	1(0.9)	1(1.1)	-	1(1.1)	1(0.9)	-
Thr	1(0.9)	-	1(0.7)	1(1.0)	-	1(1.0)
Ser	-	-	-	1(0.8)	1(0.6)	-
Glu	1(0.9)	-	1(0.9)	1(1.0)	-	1(0.9)
Pro	6(5.8)	-	6(5.8)	4(3.7)	-	4(4.0)
Gly	9(8.6)	1(1.0)	9(8.6)	7(6.7)	1(1.0)	6(6.0)
Ala	5(5.4)	-	5(4.9)	3(3.1)	-	3(3.1)
Val	1(0.9)	-	1(1.0)	1(1.1)	-	1(1.0)
Ile	-	-	-	1(1.1)	-	1(1.0)
Lys	1(1.0)	-	1(0.9)	-	-	-
Arg	1(1.1)	1(1.0)	-	2(2.4)	1(1.0)	1(1.0)
	28	3	26	22	4	18

2.2.2. Aminosäuresequenz der tryptischen Peptide =====

2.2.2.1. Die Sequenz von T 3, T 4, T 6 und T 8

Die Sequenz der kürzeren Peptide wurde durch Edmanabbau, kombiniert mit der Dansylmethode (29, 30), bestimmt.

Da auf diese Weise jedoch nur bis zu 9 Stufen nachgewiesen werden konnten, wurden die längeren Peptide mit Kollagenase nachgespalten. (s.u.)

Nachstehend sind die Sequenzen von T 3, T 4, T 6 und T 8 angeführt, wie sie durch Edmanabbau festgestellt wurden; die Pfeile unter den Aminosäuren geben an, bis zu welcher Stufe abgebaut wurde.

T 3: Asp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Ala-Lys
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

T 4: Gly-Asp-Arg
 ↓ ↓ ↓

T 6: Ser-Gly-Asp-Arg
 ↓ ↓ ↓ ↓

T 8: Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Arg
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

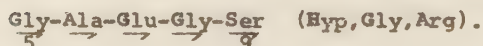
Da bei der Edman-Dansylmethode nicht zwischen Asparaginsäure und Asparagin bzw. zwischen Glutaminsäure und Glutamin unterschieden werden kann, kann die Frage, ob in T 3, T 4 und T 6 Asp in der Säureform oder amidiert vorliegt, nur aufgrund des elektrophoretischen Verhaltens der Peptide beurteilt werden. Da alle 3 Peptide neutral sind, aber eine basische Aminosäure enthalten, sollten alle drei freie Asparaginsäure enthalten. Aus dem gleichen Grund muß T 8 ein Glutamin enthalten, da es schwach basisch ist.

2.2.2.3. Die Sequenz von T 2

Die Sequenz der ersten acht Aminosäuren wurde durch Edmanabbau aufgeklärt:



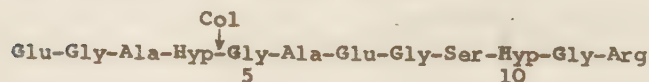
Wahrscheinlich liegen beide Glutaminsäurereste in der Säureform vor, da sich das Peptid bei der Elektrophorese schwach sauer verhält. Die Sequenz der restlichen 4 Aminosäuren konnte durch Kollagenasespaltung von T 2 und Auftrennung der Peptide an P 4 ermittelt werden. Es gelang, ein Octapeptid zu isolieren, dessen Anfangssequenz lautet:



Da Arg direkt am Carboxylende stehen muß und Hyp bisher nur an 3. Stelle eines Triplettts gefunden wurde, muß die Sequenz der letzten 3 Aminosäuren lauten: Hyp-Gly-Arg.

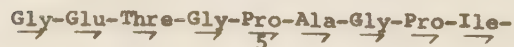
Aufgrund der Aminosäureanalyse sind die beiden Hyp zu je $70 \pm 5\%$ hydroxyliert.

Die vollständige Sequenz von T 2 lautet:



2.2.2.4. Die Sequenz von T 7

Die Sequenz der ersten 9 Aminosäuren wurde durch Edmanabbau ermittelt:



Da T 7 ein neutrales Peptid ist, und einen Argininrest enthält, muß in Pos. 2 eine Glutaminsäure enthalten sein.

Die Sequenz der Aminosäuren von Pos. 9 - 13 konnte mit Hilfe eines Thermolysinpeptides Tl 4M, das P. Wendt (31) aus α1(780)-CB C isolierte, bestimmt werden. Die Sequenz dieses Pentapeptides, durch Edmanabbau bestimmt, lautet:

Ile-Gly-Pro-Val-Gly.

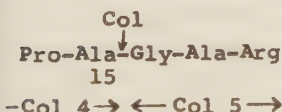
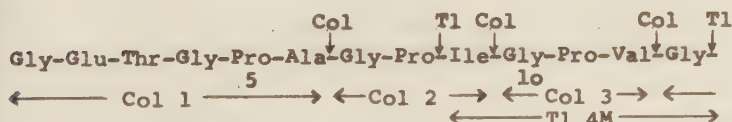
Da in α1(780)-CB C nur ein Ile enthalten ist, muß dieses Peptid ein Teil von T 7 sein und sich an die ersten 9 Aminosäuren anschließen. Die restlichen Aminosäuren aus Pos. 14 - 18 konnten wieder nach Kollagenasespaltung von T 7 aufgeklärt werden.

Abb. 16 zeigt die Auftrennung dieser Kollagenasepeptide an Aminex A 6. Alle 5 Fraktionen erwiesen sich in der Aminosäureanalyse als einheitlich, wie aus Tab. 5 zu ersehen ist. Col 1 besteht aus den Aminosäuren der Pos. 1 - 6, Col 2 aus Pos. 7 - 9; beide sind bereits sequenziert. Col 3 ist in dem Pentapeptid der Thermolysinspaltung enthalten, nimmt also Pos. 10 - 13 ein. Da das Arg enthaltende Col 5 (Gly,Ala,Arg) am Carboxylende von T 7 stehen muß, kann Col 4 nur die Pos. 13 - 15 einnehmen. Die Sequenz von Col 4 wurde durch Edmanabbau bestimmt: Gly-Pro-Ala. Die Sequenz von Col 5 muß

13 15

Gly-Ala-Arg lauten, da Arg am Carboxylende stehen muß und Gly immer am Anfang eines Triplets steht.

Die vollständige Sequenz von T 7 lautet also:



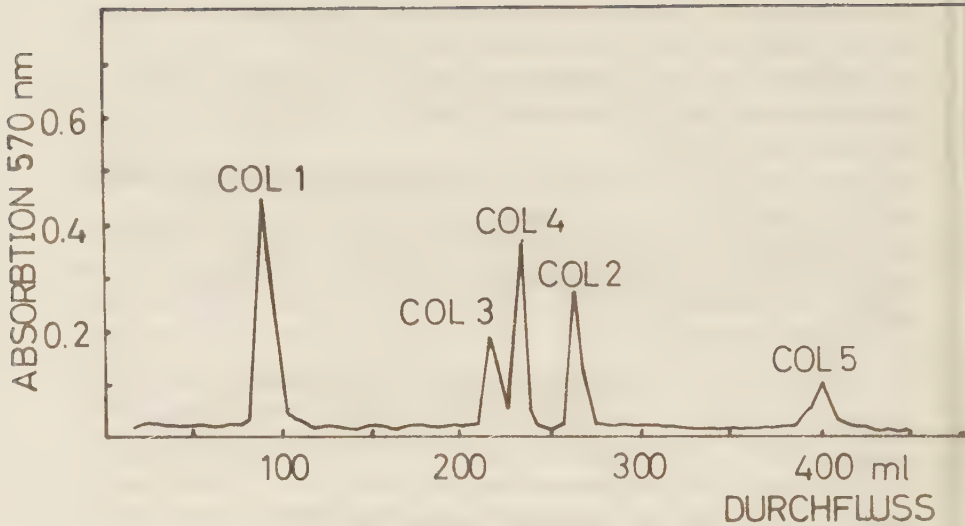


Abb. 16: Chromatographie des Kollagenasespaltgemisches von T 7 an Aminex A 6. Elutionsbedingungen s. Abb. 12 - 14.

Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung der Kollagenasepeptide von T 7

	Col 1	Col 2	Col 3	Col 4	Col 5	Summe	T 7
Thr	1	-	-	-	-	1	1(1,0)
Glu	1	-	-	-	-	1	1(0,9)
Pro	1	1	1	1	-	4	4(4,0)
Gly	2	1	1	1	1	6	6(6,0)
Ala	1	-	-	1	1	3	3(3,1)
Val	-	-	1	-	-	1	1(1,0)
Ile	-	1	-	-	-	1	1(1,0)
Arg	-	-	-	-	1	1	1(1,0)
	6	3	3	3	3	18	18

2.2.2.5. Die Sequenz von T 9

Die Aminosäuresequenz der ersten 8 Aminosäuren von T 9 wurde durch Edmanabbau bestimmt:

Gly-Asx-Hyl-Gly-Glx-Thr-Gly-Glx-(Glx, Gly, Asx, Arg)
5

Pos. 10 muß mit Gly und Pos. 12 mit Arg besetzt sein.

Pos. 9 und 11 konnten durch Säurespaltung von T 9 aufgeklärt werden. Durch Partialhydrolyse mit 0.03 n HCl wurde T 9 in 15 Peptide gespalten, deren Auftrennung an Aminex A 6 in Abb. 17 wiedergegeben ist.

Fraktion f enthält ein Octapeptid mit der Zusammensetzung: 0,9 Thr; 3,0 Glu; 3,0 Gly; 0,9 Hyl; da die Aminoendgruppe Hyls ist, muß es sich über Pos. 3 bis 10 erstrecken, und Pos. 9 kann daher nur von einem Glutamin(säure)rest besetzt sein. Damit kann in Pos. 11 nur noch der übrige Asparagin(säure)rest stehen.

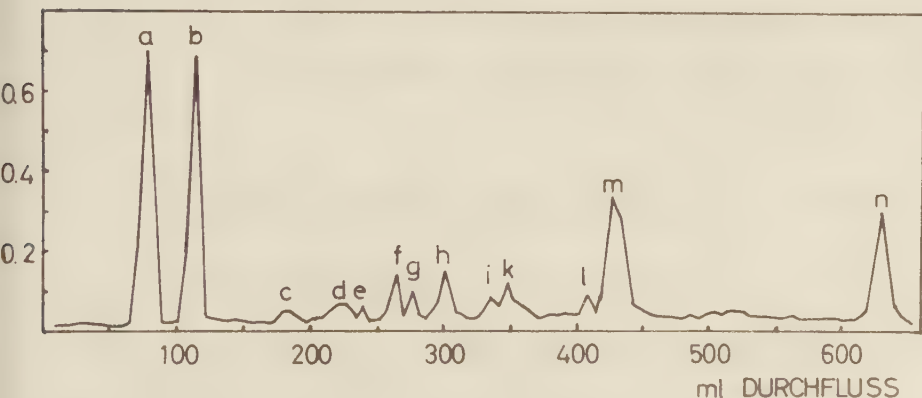


Abb. 17: Chromatographie des Säurespaltgemisches von T 9 an Aminex A 6. Elutionsbedingungen s. Abb. 12 - 14.

Die Sequenz der ersten 5 Aminosäuren des Doppelpeptides T 6 - 7, die ebenfalls durch Edmanabbau ermittelt wurde, lautet: Ser-Gly-Asp-Arg-Gly-. Dadurch steht die Reihenfolge von T 6 (Ser-Gly-Asp-Arg) und T 7 ebenfalls fest: T 6 - T 7.

2.2.3.2. Zuordnung der tryptischen Peptide mit Hilfe der Thermolysinspaltung

P. Wendt (31) konnte nach Thermolysinspaltung von $\alpha 1(780)$ -CB C durch Phosphorcellulosechromatographie und Gelchromatographie an Sephadex G 50 s elf Peptide isolieren, aus deren Aminosäurezusammensetzung sich die Reihenfolge der tryptischen Peptide ergab. Durch Edmanabbau der Thermolysinpeptide und Nachspaltung mit Trypsin wurde die Zuordnung gesichert.

In Abb. 18 ist die Peptidkette von $\alpha 1(780)$ -CB C schematisch abgebildet. Die Trypsin- und Thermolysinspaltstellen sind durch vertikale Pfeile markiert.

Durch die Überlappung der Thermolysinpeptide mit den Trypsinpeptiden entstehen nach der Trypsinspaltung der Thermolysinpeptide (oder umgekehrt) Bruchstücke der tryptischen Peptide, die eine Aneinanderkettung der letzteren erlauben.

Der Weg der Zuordnung sei hier nur kurz beschrieben:

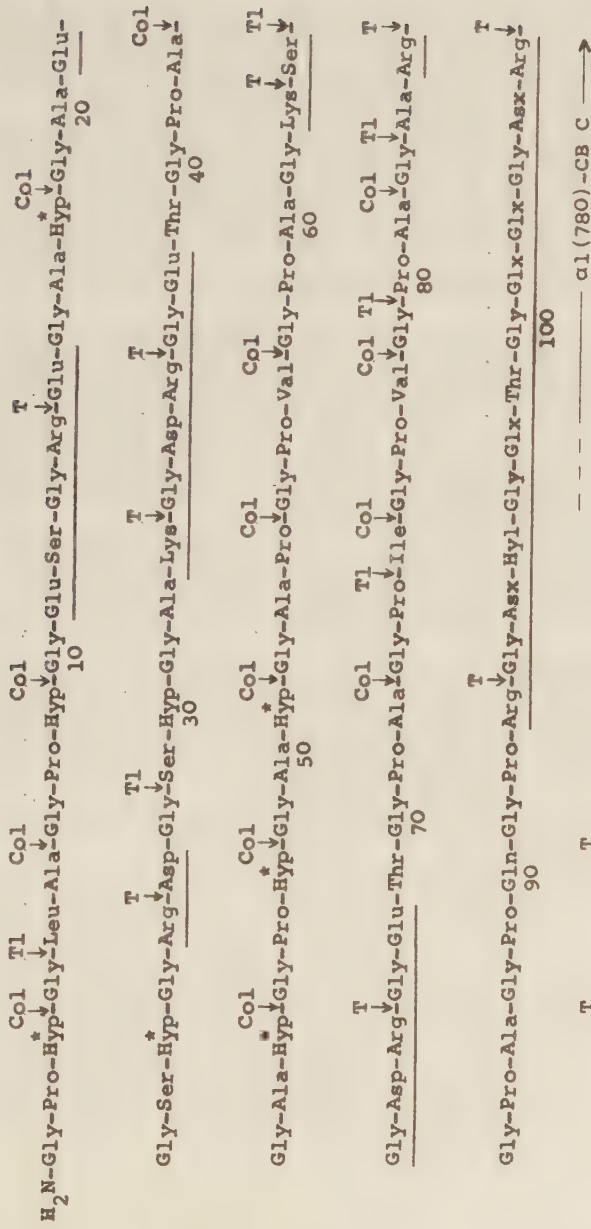
(Ausführliche Beschreibung s. (31))

1) Es wurde ein Thermolysinpeptid T1 2 (s. Abb. 18) isoliert, das nach Trypsinspaltung den C-terminalen Teil des tryptischen Peptids T 1, beginnend mit Leucin, das ganze T 2 und von T 3 alle Aminosäuren bis auf die beiden letzten C-terminalen Reste, Ala-Lys, ergab.

In T1 1 wurde das noch fehlende Aminoende von T 1 (Gly-Pro-Hyp-Gly) gefunden (s. 2.2.2.2.). Dadurch ist die Reihenfolge der Peptide T 1, T 2 und T 3 festgelegt: T 1 - T 2 - T 3.

2) In einem weiteren 51 A.s.reste langen Thermolysinpeptid T1 3 - 4 sind die beiden restlichen C-terminalen Aminosäuren von T 3 (Ala-Lys), das vollständige T 4 - 5 und von

Abb. 19: Aminosäuresequenz von $\alpha 1^*(780)$ -CB C



T = Trypsinspaltstelle

Tl = Thermolysinspaltstelle

Col = Kollagenasespaltstelle

* Hyp bedeutet, daß der Hydroxyprolinrest nur teilweise hydroxyliert ist.

2.2.4. Die Aminosäuresequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C

Die vollständige Sequenz ist in Abb. 19 angegeben. Sie basiert auf der bis jetzt immer wieder bestätigten Annahme, daß jede dritte Aminosäure Glycin sein muß und Hydroxyprolin nur an dritter Position eines Tripletts steht.

Durch die Arbeiten von Rexrodt (27) ist bekannt, daß sich an das Carboxylende der $\alpha 1$ -Kettenfragmente noch 7 Aminosäuren der $\alpha 1^*$ -Kettenfragmente anschließen (s. Einleitung). Die Sequenz dieser Aminosäuren (Pos. 106 - 112) wurde in Abb. 19 im Anschluß an die Sequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C angegeben.

Untersuchungen an chymotryptischen Peptiden von $\alpha 1$ -CB 6 von Stark und Rauterberg et al. (7) ergaben, daß sich an das Carboxylende von $\alpha 1^*(780)$ -CB C ein Phenylalaninrest anschließen muß (Pos. 113). Somit ist am Carboxylende der $\alpha 1$ -Kette von Kalbshautkollagen eine zusammenhängende Sequenz von 113 Aminosäureresten bekannt.

Diese Sequenz wurde bis Pos. 42 durch eine automatische Sequenzbestimmung mit Hilfe eines Protein-"Sequencers" (Beckman Co., Palo Alto, Californien) von P. Fietzek bestätigt.

Die mit einem Stern ^{*} versehenen Hydroxyprolinreste sind nur teilweise hydroxyliert. Der Prozentsatz der Hydroxylierung ist bei den Beschreibungen der Sequenzen der einzelnen tryptischen Peptide angegeben.

Die unterstrichenen Sequenzbereiche bedeuten Anhäufungen von polaren Aminosäuren (s. Diskussion).

3. DISKUSSION

1. Die Kombination von Kollagenaseabbau nativen Kollagens mit der Bromcyanspaltung ist eine präparativ gut verwertbare Methode, kürzere Peptide als bei der ausschließlichen Anwendung der beiden Methoden zu erhalten. Aufgrund der Kenntnisse über die Position der Methioninreste und der $\alpha 1$ -Kettenfragmente entlang der $\alpha 1$ -Kette ist eine Vorhersage über die Länge und Position der zu erwartenden Peptide möglich.

Auf diese Weise ist es gelungen, nicht nur die CB-Peptide von $\alpha 1(780)$ und $\alpha 1^*(780)$, sondern auch die der längeren Kollagenasefragmente $\alpha 1(1250)$ und $\alpha 1(1050)$ zu erhalten (26). Auch die Bromcyanpeptide des $\alpha 2(1950)$ Kollagenasefragments sind inzwischen isoliert worden (32).

Die Vorteile der kombinierten Methode liegen in wesentlich größeren Ausbeuten als bei der Bromcyanspaltung, besonders im $\alpha 1$ -CB 6-Bereich. Da $\alpha 1$ -CB 6 gegenüber $\alpha 1(780)$ -CB C um den 300 Å langen C-terminalen Bereich der $\alpha 1$ -Kette länger ist, der beim Kollagenaseabbau abgespalten wird, aber zur Ausbildung von Quervernetzungen befähigt ist, bereitet die präparative Darstellung von $\alpha 1$ -CB 6 bei Kalbshautkollagen wegen Aggregationen größere Schwierigkeiten (s. (7)).

Die Isolierung des Peptides $\alpha 1(780)$ -CB C stellte somit eine Erleichterung bei der Primärstrukturaufklärung des CB-Peptides $\alpha 1$ -CB 6 dar, dessen N-terminale Hälfte es bildet.

2. In dieser Arbeit ist es gelungen, ein 300 Å bzw. 105 A.S. langes Peptid elektronenmikroskopisch zuzuordnen. In günstigen Fällen ist eine Zuordnung von noch kürzeren Peptiden bis herab zu 50 A.S. möglich; der nach unten begrenzende Faktor ist nicht die Renaturierung, sondern die Ausfällung als SLS-Fragment und die Tatsache, daß ein einzelner Querstreifen keinem bestimmten Bereich des Querstreifungsmusters vom gesamten Kollagen mehr zugeordnet werden kann.

Eine weitere Komplikation kann eintreten, wenn die renaturierten Molekülfragmente sich in den SLS-Fragmenten antiparallel zusammenlagern und so ein symmetrisches Querstreifungsmuster ergeben, das mit dem ursprünglichen Muster im gesamten Kollagen nicht mehr übereinstimmt. Die elektronenmikroskopische Zuordnung sollte daher immer durch Aminosäureanalyse oder Fingerprints gesichert werden.

3. Durch die Bromcyanspaltung wurde ferner die Richtung der $\alpha 1$ -Kette im Kollagenmolekül bestätigt, die Piez et al. aufgrund der Ergebnisse der Bromcyanspaltung der $\alpha 1$ -Kette vorgeschlagen hatten:

Da Peptidketten von Bromcyan am Carboxylende des Methionins gespalten werden, muß dasjenige Spaltstück, das Homoserin enthält, von der Methioninposition im SLS ausgehend in Richtung des Aminoendes weisen.

$\alpha 1(780)$ -CB N, das homoserintragende CB-Peptid von $\alpha 1(780)$, liegt vom Methionin in Richtung des A-Endes (s. Abb. 2). Das A-Ende stellt also das Aminoende des Kollagenmoleküls dar.

4. Die Ermittlung der Aminosäuresequenz stellte keine grundsätzlich neuen Probleme auf. Die gute Löslichkeit aller kurzen Kollagenpeptide in verdünnten Puffern und in Wasser erleichtert ihre Handhabung im Vergleich zu anderen Proteinen ganz wesentlich.

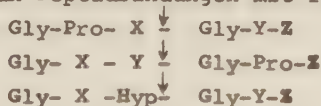
Die Trennung der tryptischen Peptide gelang trotz ihrer ähnlichen Zusammensetzung und Sequenz gut durch Dowex 1X2- und Aminex A 6-Chromatographie.

Mit Hilfe des kombinierten Edman-Dansylabbaus wurden bis zu 9 Stufen sequenziert. Am besten eigneten sich Tri- bis Hexapeptide für den Abbau. Allerdings kann mit der Dansylmethode nicht zwischen Asparagin und Asparaginsäure bzw. Glutamin und Glutaminsäure unterschieden werden, so daß diese Frage nur durch das elektrophoretische Verhalten der tryptischen Peptide entschieden wurde.

Die Nachspaltung mit Reinkollagenase von Peptiden ab einer Kettenlänge von 12 Aminosäuren erwies sich als die beste Unterstützung für den Edmanabbau, allerdings nur bei Prolin- und Hydroxyprolinhaltigen Peptiden.

Als schwierig erwiesen sich längere rein polare Peptide wie T 9, die keine durch Kollagenase spaltbaren Bindungen enthielten, und lange apolare Peptide wie T 5, die durch Kollagenase in zahlreiche Tripeptide zerlegt wurden, deren Reihenfolge sehr schwierig festzustellen war (31).

5. In Bezug auf die Spezifität der Kollagenase wurden keine wesentlichen Abweichungen gegenüber früheren Ergebnissen festgestellt (23). Die Reinkollagenase von Worthington spaltete bevorzugt an Peptidbindungen mit folgenden umgebenden Sequenzen:



Ein höherer Prolin- bzw. Hydroxyprolinanteil der umgebenden 6 Aminosäuren erhöhte die Spaltungswahrscheinlichkeit.

6. Für die Zuordnung der tryptischen Peptide erwies sich die überlappende Spaltung mit Thermolysin, die P. Wendt durchführte, als sehr erfolgreich. Thermolysin spaltete in diesen Versuchen vor Leucin, Isoleucin, Alanin, Serin und teilweise vor Glycin (31).

7. Die Aminosäuresequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C zeigt eine charakteristische Anhäufung von polaren und apolaren Aminosäuren in getrennten Bereichen. Diese Trennung wurde bereits früher aufgrund des Querstreifungsmusters postuliert. Im Gegensatz zu den Anschauungen von Beer, der eine Trennung in saure und basische Sequenzregionen forderte, sind aber in der Sequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C stets saure und basische Aminosäuren zusammen enthalten, bis auf den einzelnen Glutaminsäurerest in Pos. 21 und das einzelne Arginin in Pos. 84.

Bemerkenswert erscheint die 19 Aminosäurereste lange Sequenz

am Carboxylende, die außer den obligatorischen Glycinresten nur noch ein Threonin und ein Isoleucin an neutralen Aminosäuren enthält. (Pos. 93 - 111)

Dieser lange polare Bereich ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß der Angriff der Kollagenase auf natives Kollagen an dieser Stelle zum Erliegen kommt. In den bisher bekannten Sequenzen am Aminoende des Kollagens finden sich solche langen polaren Bereiche nicht. Daher kann die Kollagenase natives Kollagen vom Aminoende her vollständig abbauen. (24, 26)

Die apolaren Bereiche der Sequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C bestehen hauptsächlich aus den typischen Kollagensequenzen Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Hyp, Gly-Ala-Hyp usw. In der Mitte der Sequenz erstreckt sich ein langer apolarer Bereich von Pos. 40 bis 83, der nur durch einen polaren Bereich von 7 A.s.resten unterbrochen ist.

Es fällt auf, daß in der 2. Hälfte von $\alpha 1(780)$ -CB C ab Pos. 51 kein Prolin mehr an 3. Stelle eines Triplets und daher auch kein Hydroxyprolin mehr auftritt.

8. Die deutliche Abgrenzung von polaren und apolaren Regionen findet ihr Abbild im Querstreifungsmuster des SLS-Fragmentes von $\alpha 1(780)$ -CB C. In Abb. 20 ist das Querstreifungsmuster als Ausschnitt aus einem Segment von nativem Kalbshautkollagen abgebildet. (Die Aufnahme des SLS-Fragments von renaturiertem $\alpha 1(780)$ -CB C konnte nicht zum Vergleich herangezogen werden, da in diesem Segment die Moleküle antiparallel zusammengelagert sind.) In Abb. 20 sind 3 dunkle Querstreifen zu erkennen, in Zeile a darunter mit 2, 4 und 6 bezeichnet, wovon sich bei dieser Vergrößerung die Streifen Nr. 2 und 6 in jeweils 3 dünne Streifen auflösen. Ferner zeigt das Querstreifungsmuster 3 helle Regionen (1, 3 und 5).

In Zeile b ist die Aminosäuresequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C im

gleichen Maßstab schematisch abgebildet.

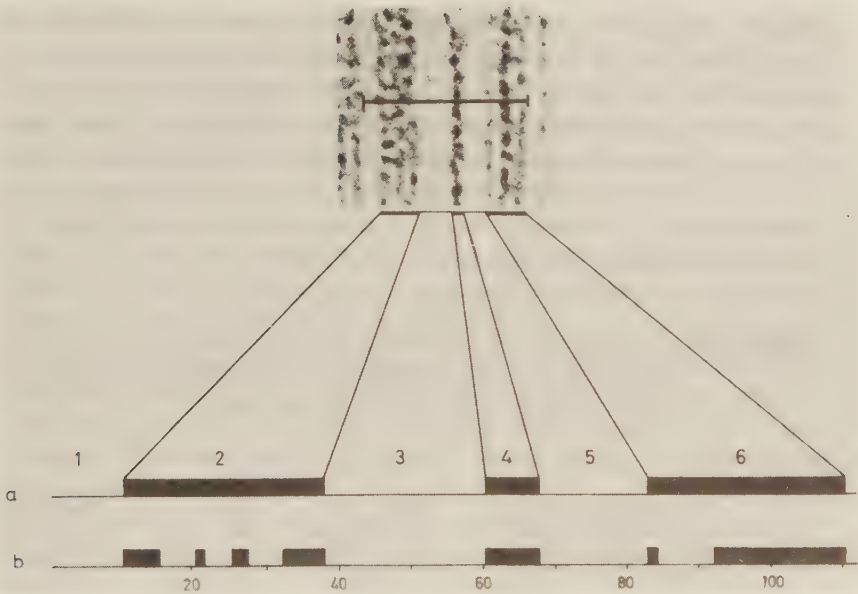


Abb. 20: Vergleich des Querstreifungsmusters mit der Aminosäuresequenz von $\alpha 1(780)$ -CB C. (a) Schematische Darstellung der hellen und dunklen Querstreifen (b) Schematische Darstellung der polaren und apolaren Sequenzbereiche. Die polaren Sequenzbereiche sind schwarz gezeichnet.

Die schwarzen Balken zeigen die Länge der polaren Regionen an. Dazwischen befinden sich die apolaren Regionen. Der Vergleich von Zeile a und b zeigt deutlich, daß eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der elektronenoptisch gemessenen Länge der Streifen und der aus der Aminosäurezahl berechneten Länge der polaren Regionen besteht.

Wie aus Tab. 6 zu entnehmen ist, hat z.B. der Streifen Nr. 2 eine Länge von 80 Å, unter der Voraussetzung, daß die Länge eines Segmentes von gesamtem Kollagen 3000 Å beträgt; der entsprechende polare Sequenzbereich erstreckt sich über Pos. 11 bis 38, d.h. über 28 Aminosäurereste. Bei einer Länge von 2,9 Å pro Aminosäurerest in der Tripelhelix ergibt das eine Länge von 81 Å. Auch die übrigen Querstreifen zeigen eine ähnlich gute Übereinstimmung.

Tabella 6: Vergleich der elektronenoptisch gemessenen und der aus der Aminosäurezahl berechneten Längen der polaren und apolaren Regionen.

Streifen Nr.	Länge (Å)	Zahl der Am.säuren	Pos. Nr.	Z.d.A.S. x 2,9
1	30	10	1 -10	29
2	80	28	11-38	81
3	65	23	39-61	67
4	22	7	62-68	20
5	43	15	69-83	43
6	80	28	84-112	81

In der Feinauflösung (vgl. Abb. 10) zeigt das Querstreifungsmuster am Aminoende eine Dreiteilung von Bereich 2, während die Sequenz in diesem Bereich 4 Unterteilungen der polaren Region aufweist. Offensichtlich werden der Glutaminsäurerest in Pos. 21 und die Arg-Asp-Gruppe (Pos. 26 - 27) im Elektro-

nenmikroskop nicht mehr aufgelöst, sondern ergeben zusammen nur eine Bande.

Auch am Carboxylende zeigt das Querstreifungsmuster eine Dreiteilung der Bande Nr. 6. Die erste schwache Bande kann nur auf den einzelnen Argininrest in Pos. 84 zurückgeführt werden. Dies ist der erste bekannte Fall, daß der Ort einer einzelnen Aminosäure im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden konnte. Die Ursache für diesen Befund kann eine Anhäufung von ATP und Phosphorwolframsäure um den Argininrest sein, die eine weitere Fällung von Uranylacetat auslöst, so daß der Farbkontrast stark genug wird um im Elektronenmikroskop sichtbar zu werden.

Der lange polare Bereich am Carboxylende des Peptids (Pos. 93 - 112) ist im Elektronenmikroskop zweigeteilt. Folgende Gründe können dafür verantwortlich sein:

a) Es ist noch nicht bekannt, ob die 3 Glutaminsäurereste in der Mitte der polaren Sequenz amidiert sind oder als freie Säuren vorliegen. Falls sie amidiert sind, können sie nicht angefärbt werden, und die polare Region ergibt im Elektronenmikroskop 2 Banden.

b) Der Einfluß der $\alpha 2$ -Kette auf das Querstreifungsmuster ist noch nicht genau bekannt. Das abgebildete Segment ist aus $(\alpha 1)_2 \alpha 2$ -tripelhelikalen Molekülen aufgebaut, während die Sequenz nur aus der $\alpha 1$ -Kette stammt. Tkocz und Kühn (34) hatten zwar festgestellt, daß sich Segmente aus reinen renaturierten $(\alpha 1)_3$ bzw. $(\alpha 2)_3$ -Molekülen in ihrem Querstreifungsmuster nicht wesentlich unterscheiden, allerdings war die Auflösung dieser Aufnahmen nicht so groß wie die in Abb. 19.

9. Auf einige bemerkenswerte Wiederholungen von Teilsequenzen von $\alpha 1(780)$ -CB C sei noch hingewiesen:

a) Fünf von sieben Argininresten kommen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Asparaginsäure oder Glutaminsäure vor:

Pos. 13 - 14: Arg-Glu; Pos. 26 - 27: Arg-Asp;

Pos. 35 - 36: Asp-Arg; Pos. 65 - 66: Asp-Arg;

Pos. 104 - 105: Asx-Arg;

b) Alle drei Threoninreste von cl(780)-CB C folgen auf Gly-Glu- (Pos. 39, 69 und 97).

c) Die beiden langen apolaren Bereiche in T 5 und T 7 werden durch die gleiche Sequenz von 9 übereinstimmenden Aminosäuren eingeleitet:

Gly-Asp-Arg-Gly-Glu-Thr-Gly-Pro-Ala-	
35	40
65	70

Die Vermutung liegt nahe, daß die Vorläufer des Kollagens aus wesentlich kürzeren Molekülen, evtl. nur 30 Aminosäurereste langen Peptidketten, bestanden, aber es ist zur Zeit sicher noch verfrüht, aus einigen Sequenzregelmäßigkeiten Aussagen über die Evolution des Kollagens machen zu wollen. Dazu wird man erst die Aminosäuresequenz des gesamten Kollagens, möglichst auch von verschiedenen Evolutionsstufen, abwarten müssen.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Darstellung von $\alpha 1(780)$ -CB C

4.1.1. Präparation von säurelöslichem Kollagen
Säurelösliches Kollagen wurde aus 5 - 9 kg schweren Kalbshäuten nach Kühn et al. (35) isoliert. Der zerkleinerte Mittelspalt der Haut wurde zweimal mit 0,5 m Na-Acetat 24 Std. bei 4° vorextrahiert und anschließend mit Leitungswasser gewaschen. Der Rückstand wurde mit dem 20-fachen seines Volumens an 0,5 m Citratpuffer, pH 3,6, 24 Std. bei 4° extrahiert und der Extrakt bei 32000 x g 2 Std. klarzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das säurelösliche Kollagen (SLK) durch Dialyse gegen Schmittpuffer (15 % KCl + 0,02 m Na_2HPO_4) gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und in 0,1 % Essigsäure aufgelöst.

4.1.2. Chemische und enzymatische Spaltungen

4.1.2.1. Kollagenaseabbau nach Stark (25)

10 g Kalbs-SLK, gelöst in 5 Liter 0,04 m CaCl_2 /0,05 m Tris-chlorid-puffer pH 7,0, wurden mit 1 g Rohkollagenase (CLSPA, Worthington Biochem. Corp., Freehold, N.J. USA) bei +10° inkubiert. Nach Rückgang der spez. opt. Drehung von $(\alpha)_{405} = -1000^\circ$ auf -500° wurde die Reaktion durch Ansäuern auf pH 3 gestoppt, und das Abbaugemisch gründlich gegen 0,1 % Essigsäure dialysiert.

4.1.2.2. Bromcyanspaltung nach Bornstein et al. (12)

100 mg Protein wurden in 20 ml 0,1 n HCl gelöst und mit dem 100-fachen molaren Überschuß an BrCN, bezogen auf den Methioningehalt, versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 Std. bei 30° wurde das Reaktionsgemisch entsalzt und lyophilisiert.

4.1.3. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die dialysierte Lösung des Kollagenaseabbaugemisches, die

etwa 0,08 mg Kollagen/ml enthielt, wurde bei 4° aufeinanderfolgend mit 15 % (Fraktion I), 21 % (Fraktion II) und 26 % (Fraktion III) Ammoniumsulfat gesättigt. Die Niederschläge wurden bei 4° und 22000 x g abzentrifugiert und in 1 % Essigsäure aufgelöst. Fraktion III, die die Hauptmenge des Molekülfragments 780 enthielt, wurde gegen den Startpuffer der CM-Cellulosechromatographie (pH 4,8) dialysiert.

4.1.4. CM-Cellulosechromatographie

4.1.4.1. " der Fraktion III

Die Trennung der α -Ketten des 780-Fragments erfolgte durch CM-Chrom. bei pH 4,8 in Abwandlung der Methoden von Butler und Piez (13) und Stark (25). Eine 15 x 2,5 cm Säule wurde mit CM-Cellulose CM 52 (Whatman) microgranular gefüllt und mit 0,05 m Na-acetat/Essigsäurepuffer pH 4,8 (Startpuffer) äquilibriert. 100 mg der denaturierten Fraktion III wurden aufgetragen und bei 40° aufsteigend mit folgendem konkaven Gradienten eluiert:

700 ml Startpuffer (im 800 ml Becherglas)

500 ml Limitpuffer (im 500 ml Erlenmeyer)

(Limitpuffer = Startpuffer + 0,1 n NaCl)

Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 120 ml/h wurden 10 Fraktionen/h aufgefangen. Das Eluat wurde kontinuierlich bei 230 nm mit einem Beckman-Spektralphotometer DB gemessen.

4.1.4.2. CM-Cellulosechromatographie der CB-Peptide

Die Trennung der CB-Peptide von $\alpha 1(780)$ wurde nach Butler u. Piez (13) an derselben Säule wie unter 4.1.4.1. durchgeführt. Die Säule wurde mit 0,02 m Natriumcitrat/Citronensäurepuffer pH 3,6, der 0,04 molar an NaCl war, äquilibriert. Die CB-Peptide wurden mit einem linearen Gradienten zwischen 650 ml Startpuffer (s.o.) und 650 ml Limitpuffer bei 40° eluiert. Limitpuffer: 0,02 m Natriumcitrat/Citronensäurepuffer pH 3,6 + 0,14 m NaCl.

Übrige Elutionsbedingungen s. 4.1.4.1.

4.1.5. Diskoelektrophorese

Die Diskoelektrophorese wurde in der von Stark (25) modifizierten Vorschrift von Reisfeld (36) mit 7,5 % Acrylamidgel durchgeführt. Als Kammerpuffer wurde 0,3 m β -Alanin/Essigsäurepuffer pH 4,6 verwendet. Die Proben (bis zu 0,2 ml) wurden vor dem Auftragen mit Harnstoff gesättigt. Die Stromstärke pro Gelröhrchen betrug 4 mA, die Spannung 150 V. Nach 4 Std. Elektrophorese wurden die Gele mit 1 % Amidoschwarzlösung angefärbt und das überschüssige Amidoschwarz mit 7,5 % Essigsäure entfernt.

4.1.6. Aminosäureanalysen

0,2 bis 1 mg Protein oder Peptid wurden mit 1 ml 5,7 n HCl versetzt und 24 Std. bei 110° unter Stickstoff hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde einrotiert und, falls Homoserin zu erwarten war, 1 Std. mit 2 % Piperidinlösung behandelt. Die Analysen wurden im Zweisäulen- und später im Einsäulenverfahren mit einem automatischen Aminosäureanalysator BC 200 der Firma Biocal durchgeführt. Die Zahl der Aminosäurereste pro Peptidkette wurde berechnet, indem der größte gemeinsame Teiler aller Molzahlen gesucht wurde, durch den dividiert sich die beste Annäherung der Reste pro Kette an ganzzahlige Werte ergab. Die Molzahl der in den geringsten Mengen enthaltenen Aminosäure wurde dabei als Einheit genommen.

Die Größenordnung des Molekulargewichtes wurde bei kleineren Peptiden teilweise durch das Elutionsvolumen bei der Molekularsiebchromatographie, bei den langen Peptiden durch die elektronenmikroskopisch gemessenen Kettenlängen kontrolliert.

4.1.7. Elektronenmikroskopische Zuordnung

4.1.7.1. Renaturierung

Die zu untersuchenden Peptide wurden nach Rauterberg und Kühn (17) gegen 0,225 m Na-Citratpuffer pH 3,7 dialysiert und zunächst 20 min. bei 36° denaturiert. Anschließend wurde

die Temperatur der Lösung so weit erniedrigt, bis sich ein erster Anstieg der optischen Drehung bei 405 nm zeigte. Je nach Peptidlänge und -konzentration wurde bei +15, 12 oder 10° renaturiert. Der Renaturierungsverlauf wurde in einer thermostatisierbaren Küvette mit einem Zeiss-Präzisionspolarimeter, Genauigkeit $\pm 0,005^\circ$, verfolgt.

4.1.7.2. Fällung von SLS-Fragmenten

Die renaturierten Peptide wurden zunächst gegen 0,1 % Essigsäure, dann gegen 0,4 % ATP-Lösung (Adenosin 5'-triphosphat, Na-Salz, krist., Serva, Heidelberg) bei pH 2,8 und +4° dialysiert. Die erhaltene Segmentsuspension wurde auf eine kollodiumbefilmte Blende aufgebracht, mit Phosphorwolframsäure angefärbt und mit Uranylacetat nachkontrastiert. Bessere elektronenoptische Aufnahmen wurden erhalten, wenn das Renaturierungsgemisch vor der Fällung mit ATP 20 Std. mit Pepsin (Kollagen: Pepsin = 20:1) bei der Renaturierungstemperatur behandelt wurde. Eine Verkürzung der SLS-Fragmente wurde dabei nicht beobachtet.

Die Aufnahmen wurden auf dem ELMISKOP I (Siemens und Halske, Berlin) gemacht. Es wurde mit einer Strahlspannung von 80000 V und einer elektronenoptischen Vergrößerung von 40000:1 aufgenommen.

4.1.8. Fingerprints

4.1.8.1. Trypsinspaltung

Für Fingerprints wurden 2 mg Protein in 2 ml 0,2 m Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,8, aufgelöst und mit 0,04 ml einer Lösung von 1 mg Trypsin in 1 ml einer 1/1000 mCaCl₂ / 1/1000 nHCl -Lösung versetzt. Das Trypsin (2 mal krist., Worthington) wurde zur Inaktivierung des Chymotrypsins mit TPCK (Mann Research, N.Y.USA) behandelt (37). Nach 4 Std. Inkubation bei 37° wurde das Gemisch mit Essigsäure auf pH 3 angesäuert und lyophilisiert. Das Peptidgemisch wurde 2-dimensional auf Schleicher u. Schüll Papier Nr. 2043 b bzw.

auf Whatman Nr. 1 aufgetrennt.

4.1.8.2. Hochspannungspapierelektrophorese

Ein 55 x 37 cm großer Papierstreifen wurde mit 0,25 M Pyridinacetatpuffer, pH 5,4, getränkt und leicht abgepreßt. Das Peptidgemisch wurde 15 cm von der Anodenseite entfernt aufgetragen. Die Elektrophorese wurde auf einer Apparatur der Fa. Hölzel, Dorfen, Obb. mit einer Spannung von 3000 - 5000 V und einer Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Nach 1,5 bis 2 Std. Elektrophoresedauer wurde der Streifen getrocknet.

4.1.8.3. Papierchromatographie

Die Papierchromatographie wurde senkrecht zur Elektrophorese-richtung absteigend mit einem Pyridin-Butanol-Wasser-Gemisch (35 : 35 : 30) durchgeführt. Nach 14 Std. wurde das Chromatogramm getrocknet, mit einem Ninhydrin-Collidin-Reagens nach Arx-Neher besprüht und 10 min. bei 100° entwickelt.

4.2. Sequenzierung von $\alpha_1(780)$ -CB C

4.2.1. Chemische und enzymatische Spaltungen

4.2.1.1. Trypsinspaltung mit dem Autotitrator

Proteinmengen über 20 mg wurden nicht in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer, sondern in Wasser mit Trypsin gespalten, wobei der pH mit Hilfe eines Autotitrators konstant gehalten wurde. 100 mg $\alpha_1(780)$ -CB C wurden in 20 ml Wasser gelöst und mit einer Trypsinlösung wie unter 4.1.8.1. im Verhältnis Protein : Trypsin = 50 : 1 vier Std. bei 37° inkubiert. Der pH wurde mit 0,01 N NaOH auf 8,0 gehalten. Der Abbau wurde durch Ansäuern auf pH 3 gestoppt.

4.2.1.2. Kollagenasespaltung (22)

Tryptische Peptide wurden in Konzentrationen von 2 - 4 mg pro ml mit 0,2 M NH_4HCO_3 aufgelöst und mit Reincollagenase (CLSPA, Worthington) im Enzym/Substratverhältnis = 1:100 24 Std. bei 37° inkubiert. Zur Verhinderung von Bakterienwachstum wurde ein Tropfen Toluol hinzugefügt. Der Abbau wurde durch Lyophilisation beendet.

4.2.1.3. Partielle Säurehydrolyse

1 - 2 mg Peptid wurden mit 1 ml 0,03 N HCl 24 bei 110° unter Stickstoff hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde einrotiert und an Aminex A 6 aufgetrennt.

4.2.2. Chromatographische Methoden

4.2.2.1. Anionenaustauscherchromatographie (38)

Eine 1,8 x 100 cm Säule wurde mit Dowex 1X2 gefüllt und mit 1 % Collidinacetat pH 8,5 äquilibriert. 100 mg Peptidgemisch, in 5 ml 1 % Collidinacetat pH 9,5 aufgelöst, wurden aufgetragen und bei 40° mit folgenden Puffern eluiert:

- 1) 100 ml 1 % Collidinacetat pH 8,5
- 2) 100 ml 1 % Collidinacetat/1 % Pyridinacetat pH 7,5
(Puffer 2)

- 3) linearer Gradient zwischen 600 ml Puffer 2 und
600 ml 2N Essigsäure

Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 45 ml/h wurden 5 Fraktionen/h gesammelt. 0,1 ml Anteile jeder Fraktion wurden in einem Technicon-Autoanalyser alkalisch hydrolysiert und mit Ninhydrin angefärbt. Die Extinction wurde bei 570 nm gemessen.

4.2.2.2. Kationenaustauscherchromatographie (22)

Die Chromatographie an Aminex A 6, einem sphärischen stark sauren Kationenaustauscher (Bio-Rad, Richmond, Californien), wurde mit einer 0,9 x 50 cm-Säule bei 50° durchgeführt. Die

Säule wurde mit 0,1 n Pyridinformiat, pH 3,1, äquilibriert. Bis zu 10 mg des Peptidgemisches wurden in 5 ml 0,1 n Pyr. formiat, pH 2,0, aufgelöst und mit 8 at. Stickstoff aufgetragen. Die Elution fand absteigend unter Verwendung einer Bio-Cal-Mikropumpe mit 15 - 20 at statt. Zuerst wurde mit 150 ml 0,1 n Pyr. formiat, pH 3,1, dann mit einem linearen Gradienten zwischen 350 ml des Startpuffers und 350 ml 2,23 n Pyridinacetat, pH 5,4, eluiert. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 50 ml/h wurden 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden wie unter 4.2.2.1. durch Ninhydrin-anfärbung getestet.

4.2.2.3. Gelchromatographie an Sephadex G 50 superfine
Das Peptidgemisch wurde auf eine 2 x 140 cm Säule, gefüllt mit Sephadex G 50 superfine, aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 35° mit 0,03 m Natriumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,8 unter dem hydrostatischen Druck einer 150 cm Puffersäule und einer Durchflußgeschwindigkeit von 21 - 23 ml/h. Das Eluat wurde bei 230 nm kontinuierlich gemessen und in 3,6 ml Fractionen aufgefangen. Die erhaltenen Fractionen wurden lyophilisiert, entsalzt und erneut lyophilisiert.

4.2.2.4. Gelchromatographie an Biogel P4
Die Gelchromatographie an P4 wurde an einer 1 x 100 cm Säule bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Peptide wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 13 ml/h mit 0,1 n Essigsäure eluiert. Das Eluat wurde bei 230 nm gemessen und in 5 ml Fractionen aufgefangen.

4.2.3. Präparative Papierelektrophorese
Proben von 5 - 10 mg wurden in einer Breite von 10 cm auf einen 14 x 55 cm großen Whatman 3MM Papierstreifen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einem 0,25 m Pyridinacetatpuffer pH 5,4 bei 4000 V und 50 mA in derselben Apparatur wie unter 4.1.8.2. durchgeführt. Nach 2 h Elektrophorese wurde das Elektropherogramm getrocknet und zur Markierung der

Banden an beiden Seiten Streifen von 2 cm Breite mit Ninhydrin angefärbt. Der nichtangefärbte Mittelteil der Banden wurde ausgeschnitten und mit 10 % Essigsäure eluiert.

4.2.4. Sequenzierungsmethoden

4.2.4.1. Endgruppenbestimmung

Die Aminoendgruppen der Peptide wurden mit Dansylchlorid nach Gray und Hartley (39, 29, 30) bestimmt. Etwa 10 nmol des Peptides wurden in 15 μ l 0,2 M NaHCO_3 Puffer pH 8 aufgelöst und 10 min. im Heizexsiccator über $\text{P}_2\text{O}_5/\text{NaOH}$ unter Ölpumpenvakuum eingedampft, um Reste von anhaftenden Aminen zu entfernen. Der Rückstand wurde in 15 μ l Wasser aufgelöst und mit 15 μ l 0,5 % Dansylchlorid in Aceton versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde das Gemisch 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann im Heizexsiccator eingedampft. Der Rückstand wurde mit 50 μ l konstant siedender 5,7 N HCl bei 110° unter Stickstoff hydrolysiert. Mit Rücksicht auf den hohen Prolin- und Glycingehalt (40) des Kollagens wurde die Hydrolysezeit auf 4 Std. begrenzt. Nach dieser Zeit konnten alle Dansylaminosäuren nachgewiesen werden. Das Hydrolysat wurde im Rotationsverdampfer eingedampft, der Rückstand mit 100 μ l wassergesättigtem Äthylacetat extrahiert, und der Extrakt eingedampft.

Zur Chromatographie der Dansylaminosäuren nach Wood und Wang (41) wurde der Äthylacetatextrakt in 5 μ l 50 % Pyridin aufgenommen und auf 3 x 3 cm Mikropolyamidplatten (F 1700) Schleicher und Schüll) aufgetragen. Es wurde zweidimensional mit folgenden Laufmittel chromatographiert:

1. Dim.: 1,5 % Ameisensäure; 2. Dim.: a) Benzol: Eisessig = 9 : 1, b) Äthylacetat: Methanol: Eisessig = 20:1:1.

Mit diesen Laufmitteln konnten alle Dansylaminosäuren getrennt und identifiziert werden.

4.2.4.2. Edmanabbau

Der Edmanabbau wurde kombiniert mit der Dansyl-Endgruppenbestimmung nach einer modifizierten Vorschrift von Gray und Hartley (29, 30) durchgeführt.

100 - 200 Mol sorgfältig gereinigten Peptides wurden in einem Schliffzentrifugenglas in 100 μ l Wasser aufgelöst. Davon wurden 5 - 10 μ l zur Dansyl-Endgruppenbestimmung abgezweigt. Der Rest wurde mit 200 μ l 5 % Phenylisothiocyanat in Pyridin (Uvasol, Merck) versetzt. Der pH wurde, falls notwendig, mit Dimethylallylamin auf pH 9 eingestellt. Nach einstündiger Reaktionszeit bei 40° im Wasserbad wurde das Gemisch in einem Heizexsiccator 30 min. über P₂O₅/NaOH bei 60° im Ölpumpenvakuum getrocknet, bis der Rückstand weiß und kristallin war. Die Spaltung und Cyclisierung wurde mit 150 μ l wasserfreier Trifluoressigsäure (Merck) 30 min. bei 40° vorgenommen. Nach Abziehen der Trifluoressigsäure im Exsiccator wurde der Rückstand mit 200 μ l Wasser aufgenommen, und die überschüssigen Reagentien sowie das Thiazolinon mit 3 x 1.5 ml Butylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden verworfen, die wässrige Schicht im Heizexsiccator wie oben eingedampft und für den nächsten Abbauschritt erneut in 100 μ l Wasser aufgelöst. Die neu entstandene Aminoendgruppe wurde wie oben mit der Dansylmethode ermittelt.

5. L I T E R A T U R

- (1) K. Kühn, "The Structure of Collagen", Essays of Biochem. 5, 59 (1969)
- (2) W. Grassmann, K. Hannig, M. Schleyer, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 71 (1960)
- (3) W. Grassmann, K. Hannig, A. Nordwig, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 333, 154 (1963)
- (4) A. Nordwig, K. Hannig, Das Leder, 14, 281 (1963)
- (5) A. Rich, F. H. C. Crick, Nature 176, 915 (1955)
- (6) A. H. Kang, P. Bornstein, K. A. Piez, Biochemistry 6, 788 (1967)
- (7) M. Stark, J. Rauterberg, K. Kühn, FEBS-Letters 13, 101 (1971)
- (8) P. M. Gallop, O. O. Blumenfeld, S. Seifter, "Treatise on Collagen", herausgegeben v. Ramachandran, Academic Press, N.Y. S. 339 (1967)
- (9) D. Volpin, H. Hörmann, K. Kühn, Biochim.Biophys.Acta 168, 389 (1968)
- (10) P. Bornstein, Biochem.Biophys.Research Com. 36, 957 (1969)
- (11) P. Bornstein, Biochemistry 2, 63 (1969)
- (12) P. Bornstein, A. H. Kang, K. A. Piez, Biochemistry 5, 3803 (1966)
- (13) W. Butler, K. A. Piez, P. Bornstein, Biochemistry 6, 3771 (1967)
- (14) K. A. Piez, E. A. Eigner, M. S. Lewis, Biochemistry 2, 58 (1963)
- (15) E. Gross, B. Witkop, J.Biol.Chem. 237, 1856 (1961)
- (16) K. A. Piez, E. J. Miller, J. M. Lane, Biochem.Biophys. Res.Com. 37, 801 (1969)
- (17) J. Rauterberg, K. Kühn, FEBS-Letters 1, 230 (1968)
- (18) F. O. Schmitt, J. Gross, J. H. Highberg, Proc.natn.Acad. Sci., USA 39, 459 (1953)
- (19) K. Kühn, E. Zimmer, Z.Naturf. 166, 648 (1961)

- (20) S. Igarashii, A. H. Kang, J. Gross, Biochem.Biophys. Res.Com. 38, 697 (1970)
- (21) P. P. Fietzek, M. Münch, D. Breitkreuz, K. Kühn, FEBS-Letters 2, 229 (1970)
- (22) P. Bornstein, Biochemistry 6, 3082 (1967)
- (23) W. T. Butler, Biochemistry 2, 44 (1970)
- (24) K. Kühn, M. Eggl, Biochem.Z. 346, 197 (1966)
- (25) M. Stark, K. Kühn, Europ.Journal of Biochem. 6, 534 (1968)
- (26) K. v. d. Mark, F. Rexrodt, P. Wendt, K. Kühn, Europ.J. Biochem. 16, 143 (1970)
- (27) F. Rexrodt, Diss.München 1971
- (28) D. A. Yphantis, Ann.N.Y.Acad.Sci. 88, 586 (1966)
- (29) W. R. Gray, Methods in Enzymology XI, 469 (1967)
- (30) W. R. Gray, J. F. Smith, Analyt.Biochem. 33, 36 (1970)
- (31) P. Wendt, Diss.München 1971
- (32) P. P. Fietzek in Vorb.
- (33) K. v. d. Mark, P. Wendt, F. Rexrodt, K. Kühn, FEBS-Letters 11, 105 (1970)
- (34) C. Tkocz, K. Kühn, Europ.J.Biochem. 7, 454 (1969)
- (35) K. Kühn, G. Schuppler, J. Kühn, Hoppe Seyler's Z. physiol.Chemie 338, 10 (1964)
- (36) R. A. Reisfeld, Nature 195, 281 (1962)
- (37) V. Kostka, F. H. Carpenter, J.Biol.Chem. 239, 1799 (1964)
- (38) G. Braunitzer, V. Rudloff, N. Hilschmann, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chemie 331, 1 (1963)
- (39) W. R. Gray, D. S. Hartley, Biochem.J. 89, 379 (1963)
- (40) C. Gros, B. Labouesse, Europ.J.Biochem. 7, 463 (1969)
- (41) K. R. Wood, K. Wang, Biochim.Biophys.Acta 133, 369 (1967)

LEBENS LAUF

Ich wurde am 8. August 1943 in Dresden als Sohn des damaligen Leutnants Robert von der Mark und seiner Frau Ilse geboren. 1946 übersiedelte unsere Familie nach München, wo ich von 1949 bis 1953 die Volksschule besuchte. Nach neun weiteren Schuljahren an der Luitpold-Oberrealschule in München legte ich 1962 die Reifeprüfung ab und begann im selben Jahr an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Chemiestudium. 1965 legte ich das Diplomchemikervorexamen, 1967 das Hauptexamen ab. Im Nov. 1967 begann ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter der Leitung von Prof. Kühn mit der Diplomarbeit, deren Thema lautete: "Kombination von Kollagenaseabbau und Bromcyanspaltung von Kalbshautkollagen". Daran schloß sich die vorliegende Dissertation an, die ich im Sept. 1970 experimentell beendete. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

